

Perfluorcarbon-Nanokapseln als Sauerstoffträger für künstlichen Blutersatz:

Synthese und Charakterisierung

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

von
Janine Bauer
aus Duisburg

Essen 2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2006 bis August 2011 im Fachbereich Chemie an der Fakultät der Physikalischen Chemie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Mayer angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Christian Mayer

Korreferent: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2013

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Perfluorcarbon-Nanokapseln als Sauerstoffträger für künstlichen Blutersatz:

Synthese und Charakterisierung“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Universität eingereicht wurde.

Duisburg, 27. März 2013

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Mayer für die Überlassung des interdisziplinären Themas sowie für seine fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Verlaufe dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Ulbricht bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot und seinen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen danke ich recht herzlich für die angenehme Zusammenarbeit und den regen Informations- und Ideenaustausch. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. T. Bramey und Dr. T. Cappelli für ihre Hilfsbereitschaft und die Verfügbarkeit ihrer Untersuchungsergebnisse für die Auswertung der Perfusionsexperimente bedanken.

Ein liebevolles Dankeschön geht an Frau K. Schwark, Herrn M. Zähres und Herrn U. Bachorski, die mir bei technischen Fragen und sonstigen Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Physikalische Chemie danke ich für die immerwährende Unterstützung und das kollegiale Arbeitsklima. Namentlich sind in erster Linie Frau C. Schlawne und Herr M. Zähres hervorzuheben. Ohne sie wären die kernresonanzspektroskopischen Messungen sowie die Interpretation der Ergebnisse nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Frau A. M. Zellermann für das unermüdliche Ertragen meiner Person, ihre Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre Freundschaft.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Herrn D. Schunk für die seit Studienbeginn andauernde Freundschaft, seine stetige Hilfsbereitschaft und seine liebevolle Fürsorge.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Personen, die sich (vielleicht zu voreilig) bereit erklärt haben, die Korrektur meiner Arbeit zu übernehmen.

Außerdem danke ich der Erich-Ritter-Stiftung für die zeitweilige Finanzierung meiner Arbeit.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mich immerzu unterstützen und die ich liebe.

Schließ deine Augen und atme tief
und hör' mal auf nur das zu glauben, was du siehst
Du weißt genau alles durchschauen, das schafft man nie
Doch was du brauchst, das ist Vertrauen und Fantasie
In einem sind eh alle gleich
und auch wenn es keinem so scheint
Obwohl wir nichts wissen, weiß jeder bescheid
Darin sind wir alle vereint
Dann fassen wir hier mal zusammen:
Hat alles mit dir angefangen
Du bist irgendwann übers Wasser gegangen
und wir sollen vom Affen abstammen?

Klar ham wir Fragen aber 'ne Antwort – ham wir leider nicht
Klar wolln wir fort, aber irgendwo ankommen – könn' wir leider nicht
Wir wolln 'ne Formel für ewigen Reichtum – krieg'n wir aber nicht
Harrison Ford oder Xavier Naidoo – sind wir leider nicht

Es könnt' alles so einfach sein – isses aber nicht!

1. EINLEITUNG	1
DIE GESCHICHTE DER BLUTTRANSFUSION	5
2. THEORIE	9
2.1 BLUT UND BLUTERSATZSTOFFE	9
2.1.1 HÄMOGLOBIN	14
2.1.1.1 Hämoglobinbasierter Blutersatz – modifiziertes Hämoglobin	14
2.1.1.2 Kommerzielle Hämoglobinprodukte	17
2.1.2 PERFLUORCARBONE	19
2.1.2.1 Perfluorcarbon-Emulsionen als Sauerstoffträger	23
2.1.2.2 Kommerzielle Produkte auf der Basis von PFC-Emulsionen	24
2.2 KOLLOIDALE TRÄGERSYSTEME	32
2.2.1 KOLLOIDE	32
2.2.1.1 Stabilität kolloidaler Systeme	34
Elektrostatische Stabilisierung (DLVO-Theorie)	36
Sterische Stabilisierung	38
2.2.2 EMULSIONEN	41
2.2.2.1 Stabilisatoren	42
2.2.2.2 Destabilisierung	44
2.2.2.3 Herstellung kolloidaler Dispersionen/Emulsionen	46
Der Ouzo-Effekt	47
2.2.3 NANOPARTIKEL	53
2.2.3.1 Polymer-Nanopartikel: Nanosphären und Nanokapseln	55
2.2.3.2 Herstellung polymerer Nanopartikel	57
Chemische Prozesse – Polymerisationsreaktionen	58
Physikochemische Prozesse	60
3. EXPERIMENTELLE ARBEIT	64
3.1 DARSTELLUNG PERFLUORCARBONGEFÜLLTER PBCA- UND PLGA- NANOKAPSELN (MITTELS OUZOMETHODE)	64
3.1.1 SYNTHESGRUNDLAGEN	64
3.1.2 PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN	65
3.1.3 PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN	66

3.2 DARSTELLUNG ÖLGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN (MITTELS ANIONISCHER GRENZFÄCHENPOLYMERISATION)	67
3.2.1 SYNTHESGRUNDLAGEN	67
3.2.2 PRÄPARATION MIGLYOLGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN	68
3.3 DARSTELLUNG PERFLUORCARBONGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN (MITTELS LÖSEMittelVERDAMPFUNG)	69
3.3.1 SYNTHESGRUNDLAGEN	69
3.3.2 PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN	70
3.4 OPTIMIERUNG DER OUZOMETHODE ZUR HERSTELLUNG PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN	71
3.4.1 OPTIMIERUNG DURCH REDUZIERUNG DER POLYMER- UND TENSIDMENGE	71
3.4.2 OPTIMIERUNG DURCH TECHNISCHE UND PRÄPARATIVE VARIATION DER OUZOMETHODE	72
3.4.2.1 Optimierung durch Angleichung an die Syntheseroute von Vitale und Katz	72
3.4.2.2 Optimierung durch Lösemittelverzicht	74
3.5 CHARAKTERISIERUNGSMETHODEN	75
3.5.1 PARTICLE TRACKING	75
3.5.1.1 Die Methode der Dunkelfeldmikroskopie	75
3.5.1.2 Bildentstehung im Mikroskop und das Auflösungsvermögen	77
3.5.1.3 Brown'sche Molekularbewegung	79
3.5.1.4 Das Verfahren des Particle Tracking	80
3.5.1.5 Probenvorbereitung zur Messung unter dem Dunkelfeldmikroskop	83
3.5.2 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	84
3.5.2.1 Die Methode der atomaren Kraftmikroskopie	84
3.5.2.2 Betriebsmodi	86
3.5.2.3 Cantilever und Spitze	87
3.5.2.4 Kraftspektroskopie	88
3.5.2.5 Probenvorbereitung zur Messung mittels Rasterkraftmikroskopie	92
3.5.3 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE	93
3.5.3.1 Die Methode der Kernmagnetischen Resonanz	93
3.5.3.2 Aufnahme eines NMR-Spektrums – Chemische Verschiebung	95
3.5.3.3 Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1	96
3.5.3.4 Übertragung der NMR-Technik auf die Untersuchung von PFD-gefüllten Nanokapseln – ^{19}F -NMR	97
^{19}F -spektroskopische Messungen an reinem Perfluorodecalin	97
Kalibrierung mit reinem, begasten Perfluorodecalin	97
Gasaustauschexperimente – Erstellen von Sauerstoffsättigungsdiagrammen	99
NMR-Experimente an Kapselproben	100
3.5.4 LEBERPERFUSION	101
3.5.4.1 Leberperfusion – Particle-Tracking-Messungen	103
3.5.4.2 Leberperfusion – NMR-Experimente	103

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	104
4.1 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PARTICLE-TRACKING-MESSUNGEN DER VIER GRUNDSYNTHESEN	104
4.1.1 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN (MITTELS OUZOMETHODE)	106
4.1.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN (MITTELS OUZOMETHODE)	108
4.1.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION MIGLYOLGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN (MITTELS ANIONISCHER GRENZFLÄCHENPOLYMERISATION)	110
4.1.4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN (MITTELS LÖSEMITTELVERDAMPFUNG)	112
4.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER AFM-MESSUNGEN DER VIER GRUNDSYNTHESEN	117
4.2.1 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN (MITTELS OUZOMETHODE)	118
4.2.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN (MITTELS OUZOMETHODE)	122
4.2.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION MIGLYOLGEFÜLLTER PBCA-NANOKAPSELN (MITTELS ANIONISCHER GRENZFLÄCHENPOLYMERISATION)	125
4.2.4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER PRÄPARATION PERFLUORDECALINGEFÜLLTER PLGA-NANOKAPSELN (MITTELS LÖSEMITTELVERDAMPFUNG)	128
4.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER OPTIMIERUNGSVERSUCHE	134
4.3.1 OPTIMIERUNG DURCH REDUZIERUNG DER POLYMER- UND TENSIDMENGE – OPTIMIERUNG 1	134
4.3.1.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle Tracking-Messungen der Optimierung 1	134
4.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der Optimierung 1	146
4.3.1.3 Ergebnisse und Diskussion der Analyse der polymerfreien Emulsion	152
4.3.1.4 Ergebnisse und Diskussion der Analyse der PFD-freien Nanosphärendispersion	155
4.3.2 OPTIMIERUNG DURCH ANGLEICHUNG DER SYNTHESEROUTE VON VITALE UND KATZ – OPTIMIERUNG 2	160
4.3.2.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle Tracking-Messungen der Optimierung 2	160
4.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der Optimierung 2	162
4.3.3 OPTIMIERUNG DURCH VERZICHT AUF GIFTIGE LÖSEMITTEL – OPTIMIERUNG 3	165
4.3.3.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle Tracking-Messungen der Optimierung 3	165
4.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der Optimierung 3	167
4.4 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE ZUR UNTERSUCHUNG DER GASAUFGABE VON NANOKAPSELN	169
Kalibrierung mit reinem, begasten Perfluordecalin	171
NMR-Experimente an Kapselproben	173
Gasaustauschexperimente – Erstellen von Sauerstoffsättigungsdiagrammen	175
4.5 LEBERPERFUSION	177
4.5.1 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER MEDIZINISCHEN ANALYSE	178
4.5.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES PARTICLE TRACKING	182
4.5.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER NMR-UNTERSUCHUNGEN	191

5. ZUSAMMENFASSUNG	194
---------------------------	------------

6. ANHANG	198
------------------	------------

7. LITERATURVERZEICHNIS	225
--------------------------------	------------

1. Einleitung

Ärzte Zeitung online, 29. Januar 2010¹

[„Ärzte ohne Grenzen“ rufen zu Blutspenden in Haiti auf

PORT-AU-PRINCE (dpa). In Haiti werden die Blutkonserven knapp. Die Hilfsorganisation „Ärzte ohne Grenzen“ appelliert an die Menschen, Blut zu spenden. „Es wird so viel operiert, wir brauchen dringend Blut“, sagte eine Mitarbeiterin der Hilfsorganisation ...]

Online Focus, 17. Juli 2010²

[Rotes Kreuz: Massiver Mangel an Blutkonserven

Wegen der Hitzewelle und Ferienzeit herrscht in Deutschland ein massiver Mangel an Blutkonserven. „Es müssen schon planbare Operationen verschoben werden, weil die benötigte Blutgruppe nicht da ist.“]

Laut einer Hochrechnung der Weltgesundheitsorganisation WHO im Jahr 2007 lag die Spenderbereitschaft für Blut respektive Blutprodukte bei gerade einmal rund 85 Millionen Blutspenden – und dies bei bzw. besser gesagt trotz einer Weltbevölkerung von insgesamt 6,9 Milliarden Menschen und einem bis zum Jahr 2015 prophezeiten Zuwachs von etwa 79 Millionen Menschen pro Jahr.³⁻⁶ Davon stammten weniger als 40% von Spendern aus Schwellen- und Entwicklungsländern, die jedoch einen Weltbevölkerungsanteil von über 80% ausmachen. Im Durchschnitt beteiligten sich von 1000 potentiellen Spendern 38 in wirtschaftsstarken, 7,5 in Schwellen- und lediglich 2,3 Personen in Entwicklungsländern an einer Blutspende. Unter dem Aspekt der lebensrettenden Maßnahme steht damit die Transfusion von Blut, aufgrund des Mangels und des globalen Ungleichgewichts vorrätiger Blutkonserven sowie konkomitierender Umstände, wie beispielsweise unzulänglich kontrollierte, viral kontaminierte oder ungeeignete Blutspenden, eindeutig zu wenigen Patienten zur Verfügung. Während die Bluttransfusion in solventeren Ländern im Allgemeinen als unterstützendes Behandlungsmittel bei invasiven medizinischen Eingriffen eingesetzt wird, besteht die Notwendigkeit zur Bluttransfusion in Entwicklungsländern vor allem bei der Therapie schwangerschaftsbedingter Komplikationen und schwerer Anämien bei Kindern in Folge von Malaria. Aufgrund fehlender Versorgungsmöglichkeiten machen solche Fälle rund 35% der Sterberate in Südafrika aus. Eine weitere Ursache stellen Gewalt und Verletzungen durch Unfälle dar, wobei sich die Anzahl der Todesopfer weltweit auf über fünf Millionen jährlich beläuft.^{6, 7}

Allein in Deutschland werden jedes Jahr gut vier Millionen Blutkonserven transfundiert. Die Tendenz ist steigend und mitunter zurückzuführen auf eine stetige Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung und der Zwangsläufigkeit lebenserhaltender chirurgischer Eingriffe sowie postoperativer Versorgung transfusionsassoziiierter Folgeerkrankungen im Allgemeinen. Gleichzeitig ist die Spenderbereitschaft jüngerer Menschen seit Jahren rückläufig und wird den zu erwartenden Verbrauch an zukünftig benötigten Blutkonserven nicht decken können. Als Folge sind ein sukzessiver Kostenanstieg im Transfusionswesen und der Handel überteuerter Blutprodukte als Luxusgut zu befürchten. Ferner führen Situationen, in denen sich eine Transfusion von allogenem Blut als ineffektiv oder gar toxisch erweist als auch die religiös oder ethisch begründete Verweigerung blutbasierender Behandlungsmethoden nunmehr zur Erwägung und Entwicklung alternativer Lösungsansätze.⁸⁻¹⁰

Eine der wohl wichtigsten Aufgaben bei der Bereitstellung von Blut besteht im Notfall, neben der Aufrechterhaltung des Blutvolumens, in der Gewährleistung einer ausreichenden und kontinuierlichen Sauerstoffversorgung lebenswichtiger Organe und Gewebe. Diese Funktion wird von den Erythrozyten, den roten Blutkörperchen, übernommen. Bereits eine kurzfristige Störung des Sauerstofftransports kann eine gesundheitsgefährdende Einschränkung und im schlimmsten Fall das Erliegen zellulärer Aktivität als Todesursache bedeuten.

Seit mittlerweile mehr als 50 Jahren wird daher die Erforschung und Innovation optionaler Sauerstofftransportmedien in Form von Blutersatzstoffen bzw. Blutsubstituten intensiv vorangetrieben.¹⁰ Die Herausforderung liegt in der Entwicklung universeller, biokompatibler, pathogenfreier, steriler und (lagerungs)stabiler Präparate, die zudem eine finanziell rentable und großtechnische Produktion zulässt. Abgesehen von biomimetischen Sauerstofftherapeutika auf Basis modifizierter Hämoglobinderivate steht die Diskussion zur Kompetenz synthetischer Analoga unter der Verwendung perfluorcarbonhaltiger wässriger Emulsionen im Mittelpunkt des aktuellen Forschungsinteresses. Die Speicherkapazität für respiratorische Gase perfluorierter Kohlenwasserstoffe ist hinlänglich bekannt und übertrifft die des Hämoglobins bei Weitem. Entgegen des sigmoidalen Verlaufs der Sauerstoffsättigung bei Hämoglobin weisen Perfluorcarbone bei der Aufnahme von Sauerstoff eine lineare Abhängigkeit vom Partialdruck auf. Aufgrund ihrer spezifischen hohen chemischen und biologischen Inertheit sind sie quasi nicht toxisch und vermeiden eine metabolisch induzierte Degradationsproblematik.

Für die intravenöse Administration ist eine Überführung der Perfluorcarbone in ein wässriges, plasmaaffines System erforderlich, welches derzeit durch phospholipidstabilisierte Emulsionen realisiert wird. Bedauerlicherweise erschweren jedoch ihre pharmakokinetischen Eigenschaften, wie beispielsweise eine zu geringe Plasmahalbwertszeit sowie die Neigung

perfluorcarbongefüllter Emulsionströpfchen zu molekularer Diffusion den medizinischen Einsatz als alleinige Primärtherapie bei sauerstoffdefizitären Störungen.

In Anlehnung an dieses Problem wird daher auf die Einführung eines bereits bekannten Verfahrens – der Einkapselung der Emulsionströpfchen – zurückgegriffen. Durch den Einschluss des perfluorierten Materials in polymere Trägersysteme (Kapseln oder Sphären) soll ein Verschmelzen der Partikel unterdrückt und gleichzeitig ihre intravaskuläre Aufenthaltsdauer und damit die Fähigkeit des Sauerstofftransports und der -versorgung heraufgesetzt werden.

Im Blickfeld dieser Arbeit steht die Ausarbeitung einer neuen Synthesestrategie für die Präparation perfluorcarbongefüllter Polyalkylcyanacrylat(PACA)-Nanokapseln, die zum Einen eine verhältnismäßig einfache sowie wirtschaftlich erschwingliche Umsetzung, zum Anderen die Produktion definierter, biologisch unbedenklicher und reproduzierbarer Ergebnisse erlaubt. Dabei liegen der Arbeitsgruppe der physikalischen Chemie von Prof. Dr. Christian Mayer der Universität Duisburg-Essen bereits fundierte Kenntnisse im Bereich der Kapselpräparation und Charakterisierung auf der Basis ölgefüllter PACA-Nanopartikel vor. Hierzu wird nach einer Variante der Synthesevorschrift von Nazir Al Khouri Fallouh et al. verfahren, in der die Partikel durch eine anionische Grenzflächenpolymerisation von Butylcyanacrylat erzeugt werden.^{11, 12} Das Monomer hat den Vorteil, dass es schnell und unter kontrollierbaren Bedingungen polymerisiert und in dieser Form biokompatibel ist. Als Reaktionsstarter dienen Hydroxidionen aus dem wässrigen Präparationsmedium, so dass das Probenmaterial keiner aggressiven Hitzeeinwirkung oder hochenergetischen Strahlung ausgesetzt werden muss. Ebenso kann auf den Gebrauch (stark) toxischer Lösemittel verzichtet werden. Die Schwierigkeit der Einkapselung von Perfluorcarbonen besteht in ihrer außerordentlich schlechten Löslichkeit in den meisten Lösungsmitteln. Daher bedarf die Herstellung perfluorcarbonbasierter Drug-Delivery-Systeme einer speziellen Synthesetechnik, welche im hiesigen Fall auf dem Prozess der spontanen Emulgierung oder kürzer: dem Ouzo-Effekt beruht, eine Methode, die beispielhaft am Vorgang der unmittelbaren Tröpfchenbildung bei der Verdünnung anisöhlhaltiger Alkoholika mit Wasser erklärt werden kann. Auf der Grundlage dieser Technik ist es möglich, perfluordecalingefüllte Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln als potentielle Sauerstoffträger mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 300 nm in einem wässrigen Medium herzustellen. Als Stabilisator wird das Tensid Synperonic F68 (Pluronic F68) eingesetzt, ein Poly(oxyethylen)-Poly(oxypropylen)-Blockcopolymer, das auch bei der Synthese der herkömmlichen, ölgefüllten PACA-Nanokapseln verwendet wird. Aufgrund der gewählten Präparationsmethode kann die Konzentration von Monomer und Tensid sehr stark reduziert werden, so dass die Wahrscheinlichkeit einer physiologischen Unverträglichkeit relativ gering gehalten und trotzdem eine ausreichende Stabilisierung der Partikel gewährleistet werden

kann. Nach der Synthese können die Nanokapseln über eine externe Begasungseinrichtung mit Sauerstoff gefüllt werden. Zu ihrer Charakterisierung stehen neben der Kernresonanzspektroskopie bildgebende Verfahren wie die Rasterkraft- und die Dunkelfeldmikroskopie zur Verfügung. Im Interesse optimierungsbedürftiger Parameter sowie erster Untersuchungen zum allgemeinen physiologischen Potential der Sauerstoffträger werden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen im Arbeitskreis um Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot Perfusionsdurchläufe am Rattenlebermodell durchgeführt.



Die Geschichte der Bluttransfusion

Die Suche nach dem ultimativen Blutersatz gestaltet sich problematisch und erfordert das Zusammenspiel verschiedener Disziplinen naturwissenschaftlicher Fachrichtungen. Dabei scheint es unerlässlich, sowohl einen Rück- als auch einen Überblick über die bisherige Entwicklung sowie den aktuellen Stand der Forschung zu gewinnen und ein Gefühl für die Unumgänglichkeit zukünftiger Alternativen und den damit einhergehenden Anstrengungen zu erhalten.

Über 350 Jahre liegen mittlerweile zwischen der erstdatierten Beschreibung des menschlichen Blutkreislaufs und der Realisierung standardisierter Verfahren in der Ausübung des Transfusionswesens.¹³ Der nachfolgende zusammenfassende Abschnitt gebührt all jenen, die durch ihre Erfahrungen und Experimente und, aus heutiger Sicht, teils dubiosen Praktiken und Hypothesen zum allgemein anerkannten wissenschaftlichen Niveau beigetragen haben. Es sei jedoch erwähnt, dass die Recherchen über die zeitlichen sowie inhaltlichen Zuordnungen aufgrund lückenhafter Überlieferungen und Unstimmigkeiten in den Quellen zum Teil schwierig waren und nicht immer glaubhaft erscheinen.

Der heute selbstverständliche und routinierte Umgang bei der Applikation von Blutprodukten bzw. der Ausführung chirurgischer oder medizinischer Maßnahmen und Therapieformen, die eine Bluttransfusion erforderlich machen, ist das Ergebnis einer seit jeher andauernden Reise durch die Geschichte der Zeit. Ihren Ursprung nimmt sie in der tief verwurzelten Sehnsucht des Menschen nach Schönheit, Macht und Unsterblichkeit und ist, wie so oft, auch eine Geschichte irreführender, fehlerhafter, religiös motivierter, un- oder pseudowissenschaftlicher, theoretischer sowie experimenteller Forschung und Erkenntnisse.

Der Bibelauszug „Denn im Blut ist das Leben“ (Levitikus, 3. Mose 17, 11) veranschaulicht die schon seit alters her zugeschriebene Bedeutung des meist rötlich gefärbten Lebenssafts. Im Alten Ägypten vertraute man der wundersamen Heilkraft von Blutbädern durch das Blut geopferter Menschen zur Behandlung leprakrankter Könige. Weiterhin wurde dem Blut in der griechischen Kultur zudem eine verjüngende Wirkung nachgesagt (Ovid, Metamorphosen). Ähnliche mythische Vorstellungen sind auch aus der römischen Geschichte überliefert. So echauffiert sich Gaius Plinius Secundus in der „*Naturalis Historia*“ über die damalige therapeutische Maßnahme gegen die Epilepsie, das Blut gefallener Gladiatoren „wie aus lebenden Bechern“ zu trinken. Der (Irr)Glaube an die Möglichkeit zur Übertragung „jugendlicher

Kräfte“ auf alte oder kranke Menschen hatte auch im Mittelalter noch Bestand und führte wohl in den meisten Fällen zu fraglichen Praktiken mit denkbar ungünstigem Ausgang.¹³⁻¹⁷

Beruhete das Prinzip der Blutaufnahme bis hierhin lediglich auf der Ebene oraler Applikation, wurden Anfang des 17. Jahrhunderts erste Überlegungen zur intravenösen Übertragung von Blut bzw. blutähnlichen Substanzen zwischen zwei Individuen angestellt. Die theoretische Grundlage dazu lieferte der englische Gelehrte William Harvey mit der Beschreibung des menschlichen Blutkreislaufs 1616 in seiner „*Exercitiatio anatomica de moto cordis*“, veröffentlicht 1628. Ansätze zur Theorie des Lungenkreislaufs existierten bereits schon im 13. Jahrhundert durch die Arbeiten von Ibn Nafis.^{18, 19}

Die erste publizierte erfolgreiche, homologe Bluttransfusion gelang 1665 in England durch Experimente von Richard Lower an Hunden. Ebenso wird Lower zusammen mit Edmund King ein Jahr später die erste Übertragung von Tierblut auf den Menschen zugeschrieben, nachdem er einem psychisch lädierten Mann Schafsblut zur Beruhigung injizierte. Lower gab seine Arbeit aber erst vier Jahre später in „*Tactus de Corde*“ bekannt.^{14, 16}

Beschwingt von den ersten durchschlagenden Erfolgen, verlor man sich auch schon in Spekulationen darüber, ob beispielsweise einem Hund Wolle, Hufe und Hörner wachsen würden, wenn man ihn mit Schafsblut transfundiert. Samuel Pepys, Mitglied und späterer Präsident der Royal Society, verlautbarte die Wunschvorstellung, den Transfusionsakt für Persönlichkeitskorrekturen zu nutzen, indem man zum Beispiel das Blut eines phlegmatisch eingestellten Menschen mit dem eines Cholerikers mischt oder die Missstimmung zwischen Mann und Frau nach einem Ehestreit durch gegenseitige Bluttransfusion behebt.^{a13}

Unabhängige analoge Versuche zur Übertragung von Tierblut auf den Menschen wurden auch in Paris von dem französischen Mathematiker und späteren Leibarzt König Louis XIV, Jean-Baptiste Denis zusammen mit dem Chirurgen Pierre Emmerez bei der Behandlung eines 15-jährigen Jungen mit Lammblood durchgeführt. Der Junge überlebte die Transfusion.¹⁶ Nachdem Denis jedoch zwei Todesfälle bei drei Blutübertragungen hinnehmen musste, kam es in Frankreich zum Ausspruch eines Transfusionsverbots und damit zum vorübergehenden Erliegen weiterer Erforschungen auf diesem Gebiet.²¹

1818 gab James Blundell, ein britischer Arzt und Geburtshelfer, einen erneuten Anstoß zur Wiederaufnahme der Forschungsarbeiten, indem er die notwendigen präparativen Techniken optimierte und Maßnahmen für eine sichere und effiziente Sammel- oder Aufbewahrungsmöglichkeit für das Blut einführte. Er beschrieb als Erster die erfolgreiche homologe Transfu-

^a Der deutsche Chirurg Richard von Volkmann äußerte sich über den damaligen, leichtfertigen Umgang mit der Transfusion von Schafsblut folgendermaßen: „Zur Übertragung von Schafsblut gehören drei Schafe: eines, dem man das Blut entnimmt, ein zweites, das es sich übertragen lässt und dazu ein drittes, das die Übertragung ausführt.“²⁰

sion von Mensch zu Mensch und proklamierte folgende Erkenntnisse: das Blut unterschiedlicher Spezies dürfe nicht gekreuzt werden, der äquivalente Austausch des Volumens bei Blutverlust sei nicht notwendig und geringe Mengen von Luft im Blutkreislauf seien nicht zwangsläufig gefährlich.^{13, 14} Seit 1825 gilt er damit als der „Vater der modernen Transfusion“ und implementierte die Bluttransfusion als Therapiemittel bei schweren Blutungen.^{15, 22} Nach Blundells Aufgabe wurden zwar noch mehrere Versuche unternommen sein Werk fortzusetzen, dabei konnten jedoch nur vereinzelt Erfolge verzeichnet werden. Das Problem bestand im Wesentlichen im mangelnden Wissen unter anderem über den Vorgang der Hämolyse, der Koagulation und dem Risiko der Infektion. Informationen, die erst einige Jahre später zum Verständnis der Problematiken der Bluttransfusion beitragen konnten. Die Angelegenheit der Blutgerinnung konnte 1835 durch Theodor L. W. von Bischoff und seine Beschreibung der Defibrination von Blut geklärt werden. Auch die Einschätzung latenter Infektionsgefahren konnte dank der Entdeckung fäulniserregender Bakterien und Pilze (Louis Pasteur) und der Einführung aseptischer Techniken 1867 durch Joseph Lister vorgenommen werden.^{13, 15}

Frustriert über die kläglichen Erfolge, wurde parallel nach Alternativen, nach potentiellen Blutsubstituten gesucht, wobei Milch als eines der ersten Materialien getestet wurde. Es wurde angenommen, dass sich die Fettpartikel der Milch in korpuskuläre Teilchen verwandeln würden. Experimente mit Salzlösungen an sogenannten Salzfröschen und nachfolgenden Urea- und Zuckerfröschen führten letztlich zur Verwendung von Ringer- bzw. Ringer-Lactat-Lösung (nach Sydney Ringer, 1883).^{13, 14, 22}

Der Grundstein für die Realisierung einer gefahrlosen Transfusion wurde allerdings erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch die revolutionären Entdeckungen Karl Landsteiners vom Pathologischen Institut in Wien gelegt. Er fand 1901 heraus, dass die Isoagglutinine A, B und C (später 0) für den variablen Ausgang der Bluttransfusion am Menschen verantwortlich sein könnten und bestimmte damit drei der vier Hauptblutgruppen. Der Nachweis der vierten, selteneren Blutgruppe AB gelang ein Jahr später Alfred von Decastello und Adriano Sturli von der II. Medizinischen Klinik in Wien. 1907 führte dann Reuben Ottenberg nach Anregungen von Ludvig Hektoen die erste Bluttransfusion unter Nutzung prätransfusioneller Kompatibilitätstests (Kreuztest) durch, um ungewünschte Transfusionsreaktionen zu verhindern. Zudem demonstrierte er die universelle Verwendung von Blut von Spendern mit der Blutgruppe 0. Einen weiteren notwendigen Fortschritt erzielte 1914 der Brüsseler Arzt Albert Hustin mit der Einführung von Natriumcitrat und Glucose als Antikoagulantien sowie Stabilisatoren und ebnete damit der Möglichkeit der Blutkonservierung den Weg, die im Verlauf des ersten Weltkriegs weiter perfektioniert wurde. Auf diese Weise erfolgten der Übergang von der direkten zur indirekten Transfusion mittels Blutkonserven und die Etablierung von Blutbanken.

Die angeblich erste „moderne“ Blutbank wurde 1937 im Cook County Hospital in Chicago, Illinois eingerichtet. Die Lagerung von Blutplasma wurde allerdings schon 1935 im Rowan Memorial Hospital in Salisbury, North Carolina umgesetzt. Mit der Zeit konnten weitere Blutgruppensysteme identifiziert werden. So konnte gegen Ende der 1930er Jahre der Rhesusfaktor von Landsteiner und dem US-amerikanischen Serologen Alexander S. Wiener bei der Untersuchung von Rhesusaffen nachgewiesen werden. Nach Beendigung des zweiten Weltkriegs entwickelte Edwin Cohen 1947 die Plasmafraktionierung mit Ethanol, wodurch die Isolierung von Gammaglobulin, Albumin sowie Fibrinogen für den klinischen Gebrauch ermöglicht wurde.^{13–15, 22, 23}

Ab Mitte der 1940er Jahre sah man sich erneut mit dem Problem der Übertragung von Infektionskrankheiten durch Bluttransfusionen konfrontiert. So wurde die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts wesentlich durch die Entdeckung und Bekämpfung viraler Erkrankungen wie Hepatitis A und B (seit Ende der 1960er Jahre), dem Immundefektsyndrom AIDS (seit 1983), Hepatitis C (seit 1989) u. a. geprägt. Seither ist der Fokus der medizinischen Forschung verstärkt auf die Entwicklung neuer und vor allen Dingen sicherer Blutprodukte und Alternativen gerichtet.²²

2. Theorie

2.1 Blut und Blutersatzstoffe

Die Herausforderung, sich der „modernen“ Problematik der Bluttransfusion und den damit einhergehenden Schwierigkeiten anzunehmen, führt primär zur Analyse und Erläuterung des Aufbaus, der Eigenschaften sowie der Funktionalität des Blutes. Neben den geforderten Ansprüchen, die sowohl an biomimetische als auch synthetische Blutersatzstoffe gestellt werden, wie z.B. eine einfache Handhabung, eine akzeptable Stabilität oder kostengünstige und normierbare Herstellungsprozesse, um nur einige zu nennen, müssen kompatible Alternativen vor allem eine wesentliche, vielleicht die wichtigste Aufgabe des Blutes übernehmen: die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung des Gewebes bei schwerem Blutverlust. Die Notwendigkeit einer Bluttransfusion besteht in der Regel, sobald der Verlust über 40% des Gesamtblutvolumens ausmacht, so dass der Transport respiratorischer Gase nicht mehr ausreichend gewährleistet werden kann.²⁴ Dabei dient die Transfusion in erster Linie der Kompensation des verlorenen Blutvolumens und der damit verbundenen Abnahme der Erythrozytenhäufigkeit. Diese sogenannten roten Blutkörperchen bestehen zum größten Teil aus dem sauerstoffbindenden Protein Hämoglobin. Hierbei werden die Sauerstoffmoleküle von den zweiwertigen Eisenionen der Häm-Gruppen reversibel gebunden, wodurch Desoxyhämoglobin in Oxyhämoglobin überführt wird. Auf diese Weise können pro Gramm Hämoglobin 1,34 ml Sauerstoff (Hüfner'sche Zahl)^b aufgenommen werden.^{25, 26}

Die Sauerstoffaufnahme des Hämoglobins findet in der Lunge durch Angleichung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) der Lungenkapillare und der Alveolen statt. Von dort gelangt der Sauerstoff über den Blutkreislauf durch die Gefäße zum Gewebe bzw. zu den Zellen.²⁷ Die Regulation der Sauerstoffaufnahme und -freisetzung durch Hämoglobin ist von der Protonenkonzentration, dem Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2), der Körpertemperatur und der Konzentration von 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) abhängig.^{28, 29} Die Sauerstoffbindungskurve, auch Sauerstoffdissoziationskurve (ODK) genannt, folgt einem sigmoidalem Verlauf (vgl. Abbildung 2.1). Der p_{50} -Wert entspricht dabei dem Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins (50% Sauerstoffsättigung) und beträgt bei Standardbedingungen 3,6 kPa bzw. 27 mmHg.³⁰ Anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufs ist zu erkennen, dass der prozentuale Anteil an gesättigtem Hämoglobin bei steigendem pO_2 sehr schnell zunimmt, so dass bereits bei 4 kPa bzw. 30 mmHg mehr als die Hälfte des Hämoglobins mit Sauerstoff

^b Im Idealfall beträgt die Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins 1,39 ml/g. Zwischen 3 und 5% des Hämoglobins liegen jedoch als nicht oxygenierbare Derivate, Dyshämoglobine (Methämoglobin, Carboxyhämoglobin), vor, so dass sich der Wert auf 1,34 ml/g reduziert.²⁶

gesättigt ist. Überdies nimmt die O_2 -Sättigung bei einer Erhöhung von 80 *mmHg* auf 100 *mmHg* praktisch nicht mehr zu, sondern bleibt konstant. Bei erhöhtem pH-Wert, niedriger Temperatur und 2,3-DPG-Konzentration und einem geringen pCO_2 kommt es zu einem Anstieg der Sauerstoffaffinität und die Kurve erfährt eine Linksverschiebung. Das bedeutet zwar eine hohe Sauerstoffsättigung bei relativ niedrigem Sauerstoffpartialdruck, zugleich ist die Sauerstoffabgabe jedoch erschwert. Im Gegensatz dazu bewirken ein geringer pH-Wert und eine erhöhte Körpertemperatur und 2,3-DPG-Konzentration sowie ein erhöhter pCO_2 eine verminderte Sauerstoffsättigung bei einem relativ hohen Sauerstoffpartialdruck, also eine erleichterte Abgabe von Sauerstoff, aufgrund einer geringeren O_2 -Affinität des Hämoglobins. Die Isotherme wird dabei nach rechts verschoben.^{31, 32}

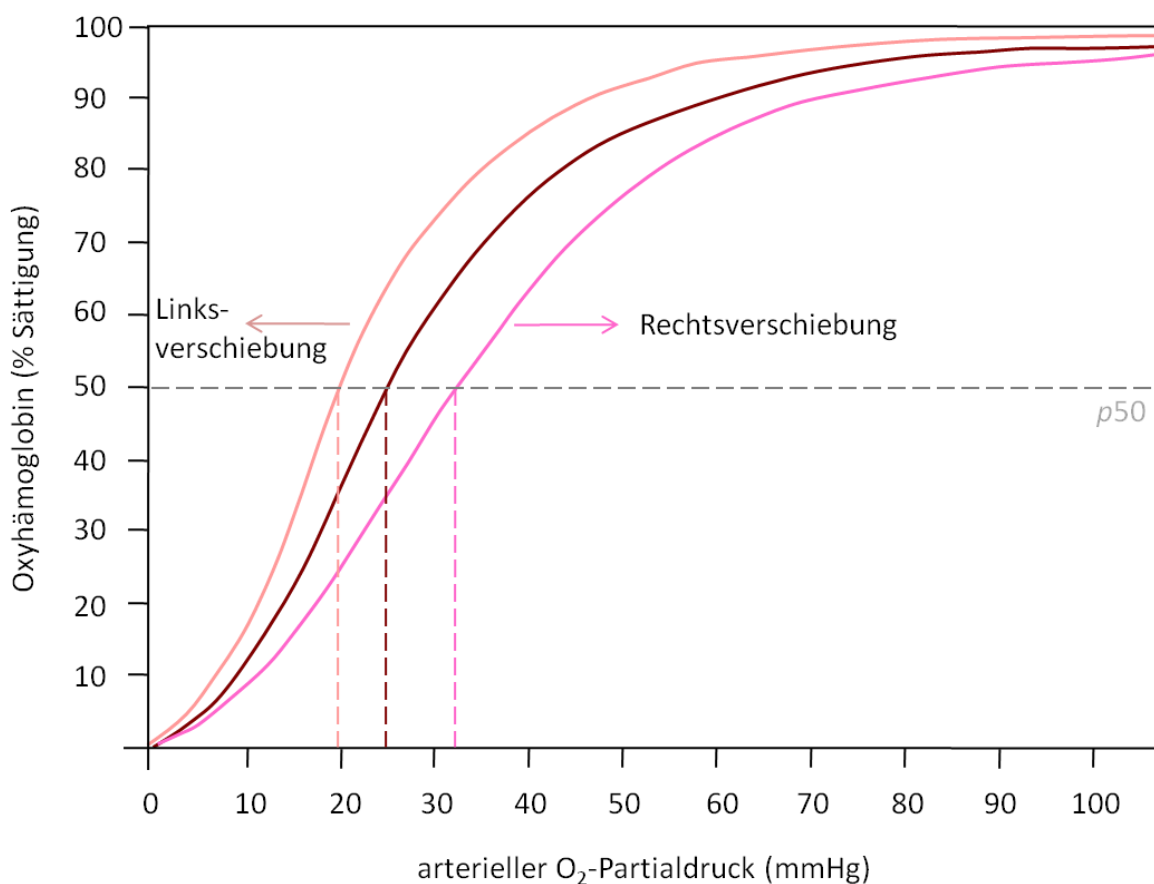


Abbildung 2.1: Sauerstoffbindungskurve für Hämoglobin. Bei einem pO_2 von 100 *mmHg* ist Hämoglobin zu ungefähr 98% mit Sauerstoff gesättigt. Der $p50$ liegt im Normalfall bei etwa 27 *mmHg*. Aus einer Abnahme der Sauerstoffaffinität resultiert eine Rechtsverschiebung, eine höhere Affinität sorgt für eine Linksverschiebung der Kurve (nach [33]).

Nur ein geringer Anteil des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs wird physikalisch im Blutplasma gelöst. Bei ungefähr 200 *ml* Sauerstoff pro Liter Blut macht er weniger als zwei Prozent des arteriellen Sauerstoffgehalts aus. Die Gesamtsauerstoffkonzentration, CaO_2 [*ml/dl*], im Blut ergibt sich demnach aus der Summe der Konzentrationen des Sauer-

stoffs, der kooperativ an Hämoglobin gebunden wird und der physikalisch im Plasma gelöst wird:

$$CaO_2 = (1,34 \times Hb \times SaO_2) + (0,003 \times PaO_2). \quad (1)$$

Der erste Summand beschreibt das Produkt aus der Sauerstoffbindungskapazität bei vollständiger Sauerstoffsättigung ($1,34 [ml/g]$), der Hämoglobinkonzentration im Blut ($Hb [g/dl]$) und dem Anteil des oxygenierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin im Blut (SaO_2). Der zweite Term bezieht sich auf die Konzentration von $0,03 ml$ Sauerstoff im Plasma pro Liter Blut bei einem Sauerstoffpartialdruck von $1 mmHg$. Aufgrund des geringen Beitrags des physikalisch gelösten Sauerstoffs zur Gesamtsauerstoffkonzentration kann der zweite Summand in der Regel vernachlässigt werden.^{26, 28, 32}

Abgesehen von der erforderlichen Kapazität für die Sauerstoffaufnahme- und abgabe sind noch einige weitere Kriterien zu erwähnen, durch die die Auswahl eines idealen Blutersatzes eingeschränkt wird. Unter anderem sind eine lange Zirkulationszeit, aber auch eine akzeptable Exkretionssgeschwindigkeit vonnöten. Das Substitut darf nicht toxisch und sollte im besten Fall ohne das Auftreten jeglicher Nebenwirkungen applizierbar sein. Darüber hinaus soll es über einen längeren Zeitraum und sowohl unter normalen als auch unter physiologischen Bedingungen stabil und kompatibel bzw. universell anwendbar sein, so dass eine breite Zielgruppe abdeckt werden kann. Weitere Aspekte betreffen die Sicherstellung einer unkomplizierten Lagerungsmöglichkeit und eine kosteneffiziente Produktion.^{34, 35}

Durch die Einführung eines solchen Blutsubstituts verspricht man sich vordergründig zwei gegenwärtige Hürden bei der Verwendung von Fremdblut respektive Spenderblut zu überwinden. Zum Einen kann auf diese Weise das Problem der gesellschaftlich umstrittenen Sicherheit von Blutspenden und dem potentiellen Risiko der Infektionsgefahr sowie anderer möglicher Transfusionsreaktionen^c aus dem Weg gegangen werden. Zum Anderen kann dadurch der zukünftig sinkenden Spenderverfügbarkeit, zurückzuführen auf eine immer älter werdende Gesellschaft, aber auch auf die Angst, sich während der Spende mit pathogenen Viren zu infizieren, begegnet werden.^{8, 9, 36–40}

Etwaige Anwendungen von Blutsubstituten finden sich zum Beispiel

- im Ersatz von Blut oder durch Kopplung mit Eigenblut während einer Operation oder der Behandlung einer schweren Verletzung,
- zur Konservierung von Organen für die Transplantation,

^c Darunter fallen beispielsweise transfusionsbedingtes Lungenversagen (TRALI), allergische und Inkompatibilitätsreaktionen oder Immunsuppression.

- zur Krebsbehandlung/-therapie.^{8, 34, 38, 41–43}

Zudem stellen sie eine unterstützende und lebensrettende Maßnahme für die Versorgung der Transfusionsmedizin in Entwicklungsländern, auf Kriegsschauplätzen oder im Fall von verheerenden Naturkatastrophen oder Unfällen dar. Eine weitere Option bietet sich Patienten, die eine Transfusion von allogenem oder auch autologem Blut aus religiösen oder ethnischen Gründen verweigern.^{9, 25, 34, 42}

Ansätze zur Entwicklung eines adäquaten Blutersatzes sind nun seit mittlerweile über 50 Jahren intensiver Bestandteil naturwissenschaftlicher Untersuchungen.¹⁰ Dabei konzentriert man sich momentan auf zwei Forschungsbereiche: die Herstellung biomimetischer Produkte, d.h. Ersatzstoffe auf Hämoglobin-Basis (engl. HBOC, Hemoglobin-Based Oxygen Carrier), und synthetische Sauerstoffträger auf der Basis von Perfluorcarbonen (PFC).^{10, 43} Ihre vorrangige Funktion ist in erster Linie die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung und weniger die Adaption der komplexen Rolle des Blutes. So erscheint es an dieser Stelle angebracht, den Terminus „Blutersatz“ im weiteren Verlauf dieser Arbeit synonym zu den Begriffen „Sauerstoffträger“ oder „Sauerstofftherapeutika“ zu verwenden.^{8, 41, 45, 46}

Ein Großteil der Produkte, die derzeit klinischen Tests unterliegen, sind injizierbare Fluide auf der Grundlage chemisch modifizierter Hämoglobin-Derivate. Im Gegensatz zu perfluorierten Kohlenwasserstoffen, die Sauerstoff in Lösung transportieren, ist er bei Hämoglobin-Produkten, entsprechend den natürlichen Gegebenheiten, an den Träger gebunden und kann somit, ähnlich der Regulation durch das native Protein, an das Gewebe abgegeben werden.

Zur besseren Überschaubarkeit sind die bisher wichtigsten Fakten in Tabelle 2.1 nochmals zusammengefasst:

Tabelle 2.1: Zusammenfassung wichtiger Fakten I

Blutersatz vs. Blutspende/Fremdblut

Problematik Blutspende/Fremdblut:	<p><u>Ressourcen:</u> abnehmende Spenderbereitschaft bzw. Spendermangel, saisonale Engpässe</p> <p><u>Kosten</u></p> <p><u>Sicherheit:</u> potentiell Infektionsrisiko, Kompatibilitätsprobleme (Transfusionsreaktionen)</p> <p><u>Stabilität:</u> begrenzte Haltbarkeit, Lagerung</p>
Abhilfe durch Blutersatz/Entwicklungsansätze:	<p>biomimetisch: Ersatzstoff auf Hämoglobin-Basis O₂ an Träger gebunden</p>
	<p>synthetisch: O₂-Träger auf Basis von PFCs O₂-Transport durch Lösen</p>
primäre Ziele des Blutersatzes:	<ul style="list-style-type: none"> - Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung - Kompensation verlorenen Blutvolumens (Erythrozytenersatz)
denkbare Anwendungsmöglichkeiten von Blutersatz:	<ul style="list-style-type: none"> - Ersatz von Blut oder Kopplung mit Eigenblut während OP bzw. Behandlung - Organkonservierung (Transplantation) - Krebstherapie - Unterstützung der Transfusionsmedizin: Entwicklungsländer, Krieg, Naturkatastrophen, Unfälle, Verweigerung von Echtblut
Anforderungen an Blutersatz:	<ul style="list-style-type: none"> - Kapazität für O₂-Aufnahme/-Abgabe - kompatibel/universell - physiologisch stabil - lagerungsstabil + unkomplizierte Lagerungsbedingungen - steril/pathogenfrei - nicht toxisch/keine Nebenwirkungen - ausreichende Zirkulationszeit/akzeptable Exkretionszeit - kosteneffiziente/kostengünstige + normierbare Herstellungsprozesse - unkomplizierte Handhabung

2.1.1 Hämoglobin

Hämoglobin (von griechisch haima = Blut und lateinisch globus = Kugel) (Hb) ist ein 64 kDa großes, tetrameres Protein innerhalb der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und besteht aus jeweils vier Polypeptidketten (allg. Monomere) mit dem Häm-Komplex als sauerstoffbindende Gruppe (siehe Abbildung 2.2).^{25, 31, 39} Jede Häm-Gruppe enthält ein Eisenatom, um reversibel Sauerstoff binden zu können. Ein gesunder Erwachsener besitzt zwischen 96 und 98% Hämoglobin A₁ (HbA₁) mit zwei α - und zwei β -Ketten ($\alpha_2\beta_2$), wobei jeweils eine α -Kette und eine β -Kette intermolekular miteinander verbunden sind. Die Affinität einer Häm-Gruppe für die Sauerstoffbindung und -freisetzung hängt von der Sauerstoffsättigung der restlichen drei Häm-Gruppen des Hämoglobinmoleküls ab und wird über allosterische Effekte gesteuert. Dabei sorgt das Enzym 2,3-DPG, das sich in der Mikroumgebung der Erythrozyten befindet, für die notwendige Konformationsänderung im Molekül (Übergang vom niederaffinen *T*-Zustand (tense) zum hochaffinen *R*-Zustand (relaxed) und umgekehrt, je nach O₂-Konzentration). Eine hohe 2,3-DPG-Konzentration begünstigt die Sauerstofffreigabe. Liegt Hämoglobin in freier Form, also außerhalb der roten Blutkörperchen, in der Blutbahn vor (zellfreies oder stromafreies Hämoglobin), zerfällt es zum Einen sehr schnell in Mono- oder Dimere, die zu einer Schädigung des renalen Systems führen können; zum Anderen wird die Sauerstoffabgabe von oxygeniertem Hämoglobin durch die Abwesenheit von 2,3-DPG erschwert.^{8, 25, 28, 31, 47}

2.1.1.1 Hämoglobinbasierter Blutersatz – modifiziertes Hämoglobin

Es ist nicht verwunderlich, dass seit Anbeginn des Forschungsinteresses die Wahl für einen Versuchsansatz trotz der zahlreichen und nicht immer vollständig verstandenen spezifischen strukturellen und funktionellen Zusammenhänge auf das Hämoglobinmolekül gefallen ist, ist es doch der natürliche Sauerstofflieferant. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurde versucht, eine Anämie mit Hämoglobin-Salzlösung zu behandeln.³⁹ Mit der Isolierung des Proteins kommt es aber auch, wie oben geschildert, zum Verlust von 2,3-DPG und der damit einhergehenden erhöhten Sauerstoffaffinität gefolgt von einer suboptimalen Sauerstofffreisetzung, der Dissoziation des Tetrameren in kleinere Komponenten und ihrer potentiellen nephrotoxischen Wirkung.

Ein bisher noch nicht aufgeklärtes Problem stellt der vasokonstriktorische Effekt des freien Hämoglobins dar. Es wird angenommen, dass es als sogenannter „NO-Scavenger“ fungiert, indem es den Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) bindet und dadurch eine Verengung der Arterien (Vasokonstriktion) verursacht. Das Zusammenziehen der Gefäße führt wiederum zu

einer Erhöhung des Blutdrucks. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der relativ kurzen intravaskulären Halbwertszeit des nackten Moleküls.^{25, 31, 48}

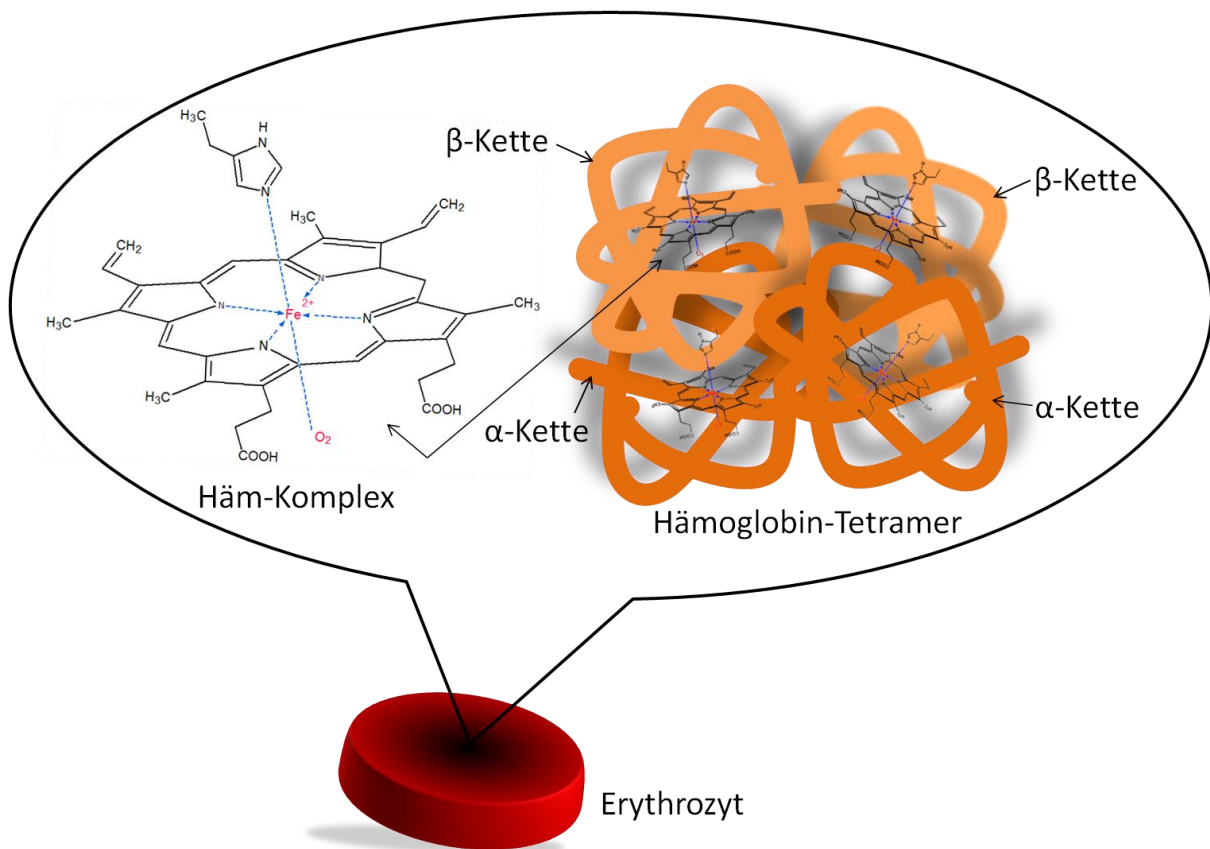


Abbildung 2.2: Hämoglobin. Erythrozyten bestehen im Wesentlichen aus dem O_2 -transportierenden Protein Hämoglobin, welches sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt, die jeweils eine prosthetische Gruppe, den Häm-Komplex, enthalten. Dort kann der Sauerstoff über das Eisenzentrum reversibel gebunden werden.

Um jedoch eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes und eine Stabilisierung zellfreien Hämoglobins im Blutkreislauf zu gewährleisten, ist eine chemische Modifizierung des Moleküls notwendig (siehe Abbildung 2.3). Die Modifikation kann im Wesentlichen auf drei Wegen erfolgen, mittels

- intramolekularer Vernetzung (cross-linking),
- Polymerisation und
- Konjugation.^{47, 49}

Durch intramolekulare Vernetzung der einzelnen Einheiten soll einer Dissoziation in $\alpha\beta$ -Dimere entgegengewirkt werden, um so die Filtration durch die Nieren zu unterbinden. Dabei wird die Vernetzung zwischen den zwei α - oder den zwei β -Untereinheiten vorgenommen, wodurch auch die Verbindung zwischen den zwei $\alpha\beta$ -Dimeren gestärkt wird. Parallel führt die Stabilisierung des Tetramers zu einer Verringerung der Sauerstoffaffinität. Momentan wer-

den Mono-(3,5-dibromsalicyl)-Fumarat (DBBF) und 2-Nor-2-Formyl-Pyridoxal-5-Phosphat (NFPLP) als Vernetzer eingesetzt.^{8, 9, 31, 39, 50}

Bei der Proteinpolymerisation kommt es mittels intermolekularer Vernetzung zu einer Vergrößerung des Proteins, indem Hämoglobin-Oligomere erzeugt werden. Dazu werden Verbindungen mit polyfunktionellen Gruppen, wie beispielsweise Glutaraldehyd oder Glycoaldehyd, verwendet und mehrere Hämoglobinmoleküle miteinander vernetzt. Mit zunehmender Größe wird eine frühzeitige Ausscheidung des Moleküls verhindert und damit die Aufenthaltszeit im Plasmastrom deutlich heraufgesetzt.^{31, 39}

Die Konjugation wird durch kovalente Bindung von Hämoglobin an biokompatible Polymere wie Dextran oder Polyethylenglykol (PEG) hervorgerufen, wodurch das Molekulargewicht ähnlich der Polymerisation zunimmt. Am Beispiel der PEGylierung werden mehrfach PEG-Ketten an die Oberfläche des Hämoglobinmoleküls addiert. Auch hier ändern sich damit die sauerstoffbindenden Eigenschaften und die intravaskuläre Zirkulationsdauer wird verbessert.^{39, 47, 51}

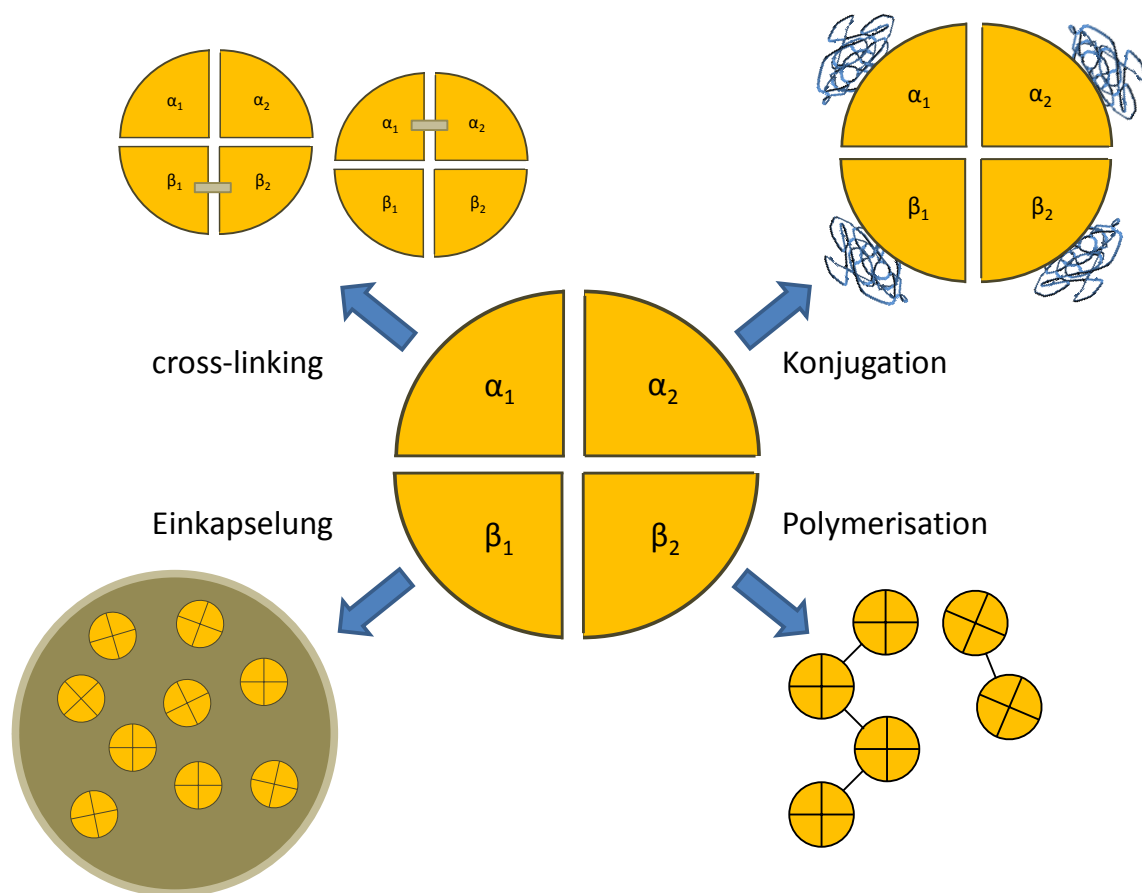


Abbildung 2.3: Modifizierungsmöglichkeiten für Hämoglobin: intramolekulare Vernetzung (cross-linking), Konjugation, Polymerisation und Einkapselung (nach [31], [43]).

Eine weitere Option stellt die Einkapselung von Hämoglobin in Gestalt künstlicher roter Blutkörper dar. Dadurch wird versucht den natürlichen Gegebenheiten, wie sie innerhalb der roten Blutkörperchen gewährleistet werden, nahe zu kommen. Doch auch hier verging trotz der Trivialität des Lösungsansatzes oder vielleicht auch gerade deshalb eine Zeitspanne von mehreren Jahrzehnten, um von der Mikro- zur Nanokapsel und von synthetischen zu biologisch abbaubaren Polymermembranen aus Kombinationen von PEG und Polymilchsäure oder Kapselwänden aus Lipiden zu gelangen. Auch der Einschluss von 2,3-DPG und anderen notwendigen Enzymen, wie z.B. Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (CAT), sowie Modifizierungen der Oberflächeneigenschaften und die Permeabilität der Kapselwand haben bislang nur zu einer Annäherung an die Merkmale und Funktionen natürlicher roter Blutkörperchen geführt.^{13, 25, 39, 43, 52}

Eine offenbar vielversprechende Neuentdeckung ist die Verwendung von Hämoglobin aus Regen- oder Meereswürmern. Die Hämoglobinmoleküle liegen bereits als größere Polymer-einheiten vor und sind bis zu 50-mal größer als das humane Tetramer. Aufgrund dessen erscheinen konventionelle Modifizierungsversuche überflüssig. Erste vorklinische Tests bestätigten die Stabilität der Polymere und zeigten eine normale Sauerstoffsättigung. Doch ist es fraglich, ob ein „Melken“ der Tiere und die dabei herauszuschlagenden Hämoglobinemengen, abgesehen von ethischen Gesichtspunkten, eine sinnvolle Alternative darstellen. Darüberhinaus haben sie ähnlich zellfreiem Hämoglobin eine blutdrucksteigernde Wirkung.²⁵

Derzeit stehen der Herstellung Hämoglobin-basierter Produkte vier potentielle Quellen zur Verfügung:

- Humanes Blut (Hämoglobin aus abgelaufenem Spenderblut),
- Rinderblut (Hämoglobin aus Schlachtblut),
- Mikroorganismen (Produktion von Hämoglobin durch genetisch modifizierte Bakterien, Pilze und Pflanzen),
- transgene Tiere (Tiere produzieren Hämoglobin durch eingepflanzte Gene).^{31, 39, 47}

2.1.1.2 Kommerzielle Hämoglobinprodukte

Den größten Erfolg hinsichtlich der Präparation eines hämoglobinbasierten Sauerstoffträgers konnte bisher die Firma Biopure Corporation aus den USA verzeichnen. Das unter dem Handelsnamen Hemopure™ bekannte Produkt der sogenannten „dritten Generation“ enthält mittels Glutaraldehyd chemisch vernetztes Rinderhämoglobin und wird zusammen mit modifizierter Ringer-Lactat-Lösung intravenös infundiert. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Hämoglobinpolymere liegt bei ungefähr 250 kDa. Der p50-Wert ist im Vergleich zu na-

tivem Hämoglobin erhöht, so dass die Sauerstoffaffinität erniedrigt ist. Mit einer hohen Temperaturtoleranz von 2 bis 30°C ist es in Form einer Lösung bis zu drei Jahre stabil, kompatibel mit allen Blutgruppentypen und daher zeitnah applizierbar.⁵³ Da der Sauerstoff prinzipiell über den Plasmastrom transportiert wird, ist eine Sauerstoffversorgung auch bei niedrigem Blutdruck und durch verengte Gefäße gewährleistet. Seit 2001 ist Hemopure™ als Therapeutikum zur Behandlung von akuter Anämie bei Erwachsenen in Südafrika zugelassen, um die Verbreitung von HI-Viren durch Bluttransfusionen einzugrenzen. Es wird aber nur sehr selten eingesetzt. In den USA und Westeuropa wurde 2005 Phase III der klinischen Prüfungen eingeläutet. Es ist aber zu erwarten, dass es aus Angst vor der potentiellen Gefahr der Übertragung von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) keine große Akzeptanz in der Öffentlichkeit finden wird.^{25, 47, 54, 55}

Weitere Produkte wie Hemolink™ (Hemosol Incorporated, vernetztes humanes Hämoglobin), Hemospan™ (Sangart Incorporated, konjugiertes humanes Hämoglobin) oder Optro™ (Baxter International, vernetztes Hämoglobin aus genetisch veränderten E. coli Bakterien) befinden sich derzeit noch in klinischen Tests.^{25, 54}

Die wichtigsten Informationen über hämoglobinbasierte Blutersatzstoffe sind in der nachfolgenden Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung wichtiger Fakten II

Blutersatz auf Hämoglobinbasis

Hämoglobin-Modifikationen	in erster Linie zur Vergrößerung des Hb-Moleküls <ul style="list-style-type: none"> - intramolekulare Vernetzung (cross-linking) - Polymerisation - Konjugation - (Einkapselung)
Hämoglobin-Quellen	<ul style="list-style-type: none"> - humanes Blut - Rinderblut - Mikroorganismen - transgene Tiere
Hämoglobin-Produkte	<u>Hemopure™</u> (Biopure Corporation) mittels Glutaraldehyd chemisch vernetztes Rinderhämoglobin, Zulassung in Südafrika 2001
	<u>Hemolink™</u> (Hemosol Incorporated) vernetztes humanes Hämoglobin, Testphase
	<u>Hemospan™</u> (Sangart Incorporated) konjugiertes humanes Hämoglobin, Testphase
	<u>Optro™</u> (Baxter International) vernetztes Hämoglobin aus genetisch veränderten E. coli Bakterien, Testphase

2.1.2 Perfluorcarbone

Eine weitere große Klasse von Sauerstofftherapeutika bilden Emulsionen auf der Basis von Perfluorcarbonen. Die Option, auf artifizielle Blutersatzstoffe zurückgreifen zu können und sich damit der Abhängigkeit dringender biologischer Produktionsquellen oder Vorräte zu entziehen, stellt einen ungeheuren Vorteil gegenüber der Entwicklung von Blutsubstituten auf Basis des natürlichen Gegenspielers Hämoglobin und seiner Derivate dar. Gleichzeitig senkt der Einsatz nichtbiologischer Materialien das Risiko zur Übertragung pathogener Mikroorganismen oder infektiöser Viren.

Perfluorcarbone sind farb- und geruchlose synthetische Flüssigkeiten und leiten sich in formeller Hinsicht von den Kohlenwasserstoffen ab, in dem die Wasserstoffatome durch Fluor- atome substituiert werden. Im Allgemeinen werden darunter sowohl vollständig fluoriierte (von lateinisch per = völlig) als auch lediglich partiell fluoriierte organische Verbindungen ver-

standen. Letztere können neben Wasserstoffatomen auch Stickstoff-, Sauerstoff- und/oder andere Halogenatome enthalten. Dabei sorgen die Einführung von Fluoratomen und der Ersatz aller Wasserstoffatome für eine Reihe gänzlich neuer und attraktiver Eigenschaften, die sie für die biomedizinischen und anderweitigen Anwendungen so wertvoll machen. Die zugeschriebenen Besonderheiten sind auf ihre spezifische elektronische Struktur und der daraus folgenden größeren räumlichen Beanspruchung der Fluoratome (Van-der-Waals-Radius $\sim 140 \text{ pm}$) und der Fluoralkylketten im Gegensatz zu den „einfachen“ kleineren Wasserstoffatomen (Van-der-Waals-Radius $\sim 120 \text{ pm}$) zurückzuführen. Als Konsequenz sind die voluminösen fluorierten Ketten sehr viel starrer als die flexiblen Kohlenwasserstoffketten, so dass die Möglichkeiten der Konformationsänderungen stark eingeschränkt sind. Um der sterischen und energetischen Barriere auszuweichen, nimmt das Kohlenstoffgerüst eine eher helikale Anordnung anstelle der üblichen planaren Zick-Zack-Konfiguration der Wasserstoffanaloge ein.^{25, 42, 56–58}

Aus thermodynamischer Sicht weisen Perfluorcarbone eine sehr hohe Stabilität auf, die sich durch die extreme Festigkeit der Kohlenstoff-Fluor-Bindung^d und den damit einhergehenden erhöhten Bindungsenergien innerhalb des Kohlenstoffgerüsts^e auszeichnet.⁵⁶ Zusätzlich erzeugen die Fluoratome, aufgrund ihrer hohen Elektronendichte, eine kompakte, abstoßende Elektronenschicht, die das Molekül vor äußeren Angriffen durch andere chemische Agentien schützt (Scotchguard Effekt).^{25, 58} Ein weiterer Grund für die fehlende Reaktionsbereitschaft ist der Mangel an energetisch niedrigen Atomorbitalen, um beispielsweise Sauerstoff oder Kohlenstoffmonoxid binden zu können. Gegenüber gewöhnlichen Kohlenwasserstoffen weisen sie daher eine hohe Temperatur-, Säure- bzw. Laugen- und UV-Resistenz auf. Zusammen mit der geringeren Polarisierbarkeit der Fluoratome lassen sich damit gleichzeitig die chemische und biologische Inertheit perfluorierter Verbindungen erklären.^{35, 46, 56} Hinzu kommen eine sehr ausgeprägte Hydro- sowie Lipophobie, die die Sonderstellung perfluorierter Materialien, aber auch die Schwierigkeit ihrer Handhabung und Verwendung hinsichtlich ihrer geringen Löslichkeit in Wasser oder anderen, organischen Substanzen hervorheben. Infolge der zu vernachlässigenden Polarisierbarkeit der Fluoratome sind die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Molekülen entsprechend der intermolekularen Kohäsionskräfte marginal. Neben der geringen Löslichkeit macht sich dieser Charakter vor allem in den bezüglich des Molekulargewichts recht hohen Dampfdrücken, hohen Schmelz- und tiefen Siedepunkten und der sehr geringen Oberflächenspannung bemerkbar.^{42, 58}

Ergänzend sind die sehr hohen Dichten flüssiger Perfluorcarbone, ihre hohe Fluidität und Kompressibilität, ihre vergleichsweise niedrigen Brechungsindices und Dielektrizitätskonstan-

^d z.B. 530 kJ/mol in C_2F_6 vs. 418 kJ/mol in C_2H_6

^e z.B. 413 kJ/mol $\text{CF}_3\text{-CF}_3$ vs. 371 kJ/mol $\text{CH}_3\text{-CH}_3$

ten als auch ihr extrem gutes Lösungsvermögen für respiratorische und andere nichtpolare Gase zu erwähnen.^{42, 58} Letzteres erklärt sich durch die geringen Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und den damit ausbleibenden Kohäsionskräften. Auf diese Weise lassen sich Materialien mit ähnlich schwachen intermolekularen Anziehungskräften, insbesondere Gase, sehr gut in Perfluorcarbonen lösen. Es handelt sich dabei jedoch um einen rein physikalischen Vorgang, die Gase werden nicht chemisch gebunden. Dies stellt einen Vorteil in Bezug auf eine intravenöse Verabreichung dar, da Perfluorcarbone somit, im Gegensatz zum Hämoglobin, auch in Gegenwart von Kohlenstoff- oder Stickstoffmonoxid für den Sauerstofftransport geeignet sind. Der Grad der Löslichkeit kann mit Hilfe des Hildebrandparameters numerisch abgeschätzt werden. Vergleichbare Parameter bedeuten vergleichbare Lösungseigenschaften. Unter Berücksichtigung dieser Werte ergibt sich eine bessere Löslichkeit für Sauerstoff in Perfluorcarbonen als beispielsweise in Wasser. Veranschaulichen lässt sich dies, indem man die strukturellen Unterschiede der beiden Flüssigkeiten in Betracht zieht. Im Wasser kommt es durch Wasserstoffbrückenbindungen zur Ausbildung eines räumlichen, engmaschigen Netzwerks, in Perfluorcarbonen herrscht dagegen, aufgrund der schwachen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen, kein grundlegendes strukturelles Gerüst vor. Infolge ähnlich schwacher Kohäsionskräfte ist es den Sauerstoffmolekülen möglich oder erlaubt, Perfluorcarbonmoleküle zu verdrängen und sich zwischen ihnen, innerhalb sogenannter molekularer Kavitäten, einzuordnen. Daneben ist die Löslichkeit natürlich auch von dem einzuschließenden molekularen Volumen des Gases abhängig und nimmt in der Reihenfolge $\text{CO}_2 \gg \text{O}_2 > \text{CO} > \text{N}_2$ ab. Gleichzeitig ist sie umgekehrt proportional zum Molekulargewicht und Verzweigungsgrad und direkt proportional zur Anzahl der Fluoratome der PFCs, so dass lineare Verbindungen eine größere Aufnahmebereitschaft zeigen als zyklische Perfluorkohlenwasserstoffe mit ähnlichem Molekulargewicht. Im Rahmen der Untersuchung von Perfluorverbindungen als potentielle Sauerstoffträger liegt die Löslichkeit von Sauerstoff bei 37 °C und 1 atm bei ungefähr 40 bis 50 Vol.-% (im Vergleich zur Löslichkeit in Wasser mit ca. 2,5 Vol.-%). Dagegen erreicht die Löslichkeit von CO_2 unter denselben Bedingungen über 200 Vol.-%. Im Gegensatz zur Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verläuft die Gaslöslichkeit in Perfluorcarbonen bei gegebener Temperatur linear mit dem Sauerstoffpartialdruck und folgt damit dem Henry-Gesetz (siehe Abbildung 2.4).^{56, 59} Sie ist von allosterischen Effekten und anderen Bedingungen unabhängig, so dass der Sauerstoff je nach Anforderung schnell und in großen Mengen aufgenommen und wieder abgegeben werden kann.⁸ Das im Körper befindliche Perfluorcarbon ist dank seines ausgeprägten inerten Charakters nicht toxisch und wird vom Organismus nicht metabolisiert, sondern kann ganz einfach über die Lunge abgeatmet werden. Begleitend gewährleistet die hohe Bereitschaft zur Gasaufnahme die Regulation des Kohlenstoffdioxidhaushalts über die Absorption von CO_2 im Gewebe und den Abtransport zurück zur Lunge, so dass die wesentlichen

Grundzüge der Atmung sichergestellt werden. Die Notwendigkeit zur chemischen Modifizierung ist nicht gegeben.^{25, 40, 42, 58}

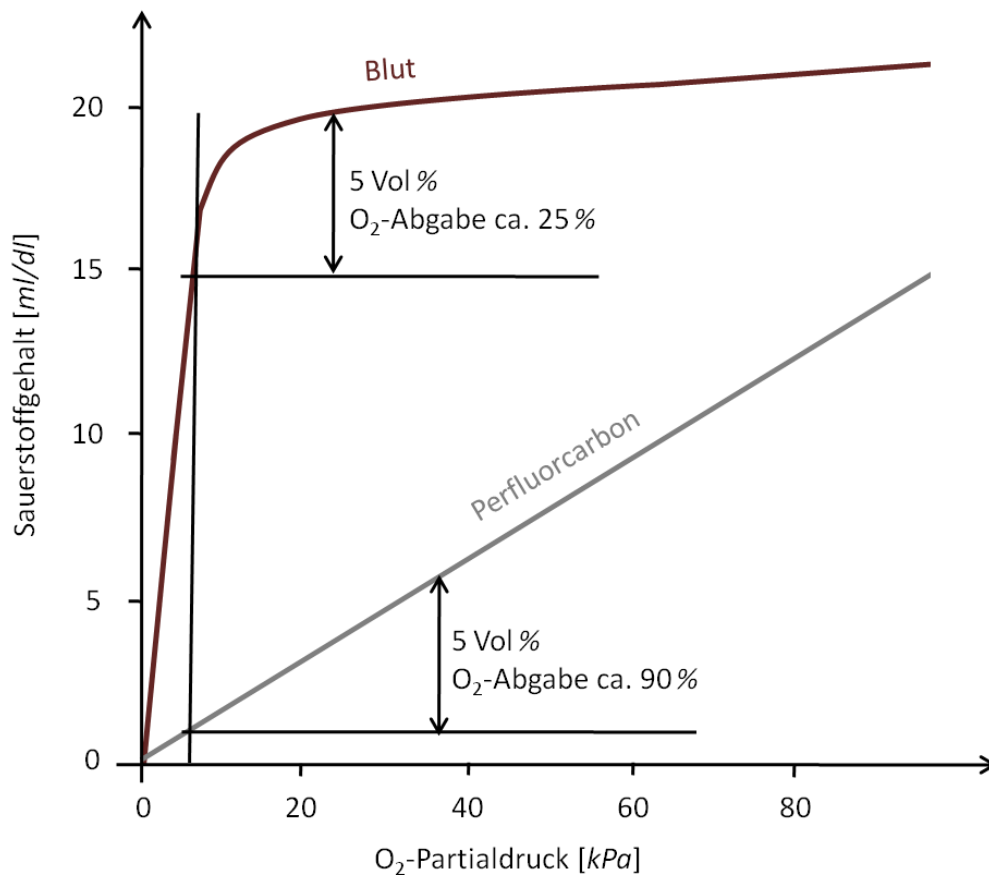


Abbildung 2.4: Sauerstoffdissoziationskurve von nativem, humanem Blut und einer Perfluorcarbon-emulsion. Im Gegensatz zu Blut verläuft die Sauerstoffsättigungskurve bei Perfluorcarbonen linear (nach [60]).

Die Möglichkeit der synthetischen Produktion von Perfluorcarbonen gewährleistet einen potentiell uneingeschränkten und verlässlichen Zugriff auf das Rohmaterial für nachfolgende technologische, biotechnologische und biomedizinische Anwendungen. Dabei spielen auch hier, sowohl für die großtechnische Herstellung als auch für die weiteren Verwendungen und Aufbereitungen, eine unkomplizierte Prozessführung und ihre Rentabilität eine wichtige Rolle. Zugleich kann sich daraus eine günstige Option zur Versorgung der Transfusionsmedizin für ärmere Nationen oder Entwicklungsländer ergeben.

Erste Versuche zur Synthese von Perfluorcarbonen wurden während des zweiten Weltkriegs im Rahmen des Manhattan Projekts als Material zur Handhabung von Uranhexafluorid in Zusammenhang mit dem Bau der Atombombe unternommen.⁵⁹ Heute erfolgt die Herstellung qualitativ hochwertiger Perfluorcarbone im industriellen Maßstab allgemein über nucleophile Substitution der Wasserstoffatome ausgewählter Kohlenwasserstoffe durch Fluor. Dazu bedient man sich der Methode der elektrochemischen Fluorierung organischer Verbindungen mittels schwerer Metallfluoride oder durch direkte Behandlung mit elementarem Fluor. Eine

Alternative bietet die Zusammensetzung bereits fluorierter Blockeinheiten zu den gewünschten Produkten.⁵⁸ Prinzipiell kann so eine große Vielfalt an möglichen Verbindungen umgesetzt werden. Wie die entsprechenden Alkylverbindungen können sie in linearer, zyklischer oder polyzyklischer Form vorliegen.

2.1.2.1 Perfluorcarbon-Emulsionen als Sauerstoffträger

In Hinblick auf den gezielten Einsatz von Perfluorcarbonen im biomedizinischen Bereich, im Speziellen für die Verwendung als Sauerstoffträger, wird die Auswahl adäquater, perfluorierter Verbindungen durch bestimmte medizinische Auflagen und materielle Ansprüche eingeschränkt. Die erste Barriere, die es zu durchbrechen gilt, liegt in der Natur der Perfluorcarbone und betrifft ihre Eigenschaft, sich nicht bzw. in nicht ausreichender Weise mit Wasser und folglich auch nicht mit Blut oder Blutplasma zu mischen. Um trotz dessen eine parenterale Verabreichung perfluorcarbonbasierter Therapeutika zu ermöglichen, werden wässrige PFC-Emulsionen hergestellt und auf diesem Wege eine Aufnahme in den Blutkreislauf verwirklicht.⁴⁶ Allerdings kommen mit der Einführung solcher Emulsionen weitere oder zusätzliche Bedingungen hinzu, die unter dem Gesichtspunkt eines synthetischen Blutersatzstoffs erfüllt werden wollen. Dabei ist vor allen Dingen ein passgenaues Zusammenspiel von angemessener Retentionszeit und der Fähigkeit zur Bildung einer stabilen Emulsion immens wichtig. Denn mit steigendem Molekulargewicht des Perfluorcarbons lässt sich zwar die Stabilität der Emulsion heraufsetzen, im selben Moment wird jedoch auch die Wasserlöslichkeit des Perfluorcarbons beeinträchtigt und als Folge die Organ-Retentionszeit erhöht. Da die Geschwindigkeit der Eliminierung der Fluorverbindungen, per Exhalation über die Lunge, von ihrer Löslichkeit in den Blutlipoproteinen abhängt, kann durch Beimengung leicht lipophiler perfluorierter Stoffe oder die Einführung schwererer Halogenanteile oder Kohlenwasserstofffragmente in die Perfluorcarbonmoleküle Abhilfe geschaffen werden.^{40, 56, 58}

Einen weiteren Spagat erfordert die Werkstellung der Synthese hochkonzentrierter und hochfluider Emulsionen ohne Nebenwirkungen. Bei der Applikation bestimmter bisher auf dem Markt existierender Sauerstofftherapeutika auf der Basis von Perfluorcarbonemulsionen konnte eine grippeähnliche Symptomatik als negative Folgeerscheinung mehrfach beobachtet werden. Infolge ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften werden die Emulsionströpfchen nach Eintritt in die Blutbahn von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) phagozytiert, weshalb ihre intravasale Halbwertszeit in Abhängigkeit von der Dosierung im Durchschnitt lediglich fünf bis neun Stunden beträgt. Nach intrazellulärer Metabolisierung übriger Emulsionsbestandteile (Emulgator) gelangt das Perfluorcarbon unverändert ins Blut zurück und kann über die Lungenalveolen abgeatmet werden. Dieser Vorgang verläuft sehr langsam und kann eine zeitliche Dauer von bis zu 20 Tagen umfassen. Eine überhöhte Dosie-

zung zwecks gesteigerter Perfluorcarbonkonzentration führt letztlich, entsprechend einer verstärkten Aufnahme der PFC-Tröpfchen, zu einer Überladung des RES, was wiederum immunsuppressive Effekte und das Auftreten grippaler Beschwerden nach sich ziehen kann.^{8,}

^{35, 56} Ein potentieller Lösungsansatz und zugleich eine weitere Anforderung an die Emulsionen sind möglichst kleine Tröpfchendurchmesser (im Submikrometerbereich) und eine schmale Polydispersität der gesamten Größenverteilung.⁴⁰ Die geringe Partikelgröße senkt zum Einen die Wahrscheinlichkeit der Identifikation durch das retikuläre Bindegewebe, birgt aber auch eine im Verhältnis zum Volumen relativ große Oberfläche, an der ein effizienter Gasaustausch stattfinden kann. Zudem können mittels kleinerer Emulsionströpfchen Gefäßabschnitte oxygeniert werden, die für die größeren Erythrozyten in der Regel nicht passierbar sind.^{60, 61}

Von hoher Relevanz ist auch die Wahl eines geeigneten Emulgators bzw. Surfactants. Seine Aufgabe besteht in der Herabsetzung der Grenzflächenspannung und der Stabilisierung der gebildeten Emulsionströpfchen, wobei der Anspruch erhoben wird, dass eine effiziente Perfluorcarbonemulsion eine Mindesthaltbarkeit von zwei Jahren ohne wesentliche Veränderung der Partikelgröße aufweisen sollte. Bei konventionellen Systemen handelt es sich zum Einen um Poloxamere, neutrale Block-Copolymere, wie z.B. das Poloxamer 188, auch bekannt unter dem Handelsnamen Pluronic F68, aufgebaut aus amphiphilen Poly(oxyethylen)-Poly(oxypropylen)-Einheiten. Zum Anderen werden Phospholipide eingesetzt, wobei sich mit der Zeit die Verwendung von Eigelblecithinen (engl. EYP, Egg Yolk Phospholipid) als biokompatible und effiziente Emulgatorsubstanzen durchsetzen konnte. Die Präparation EYP-basierter Perfluorcarbonemulsionen erfolgt im Allgemeinen mittels Homogenisierung über ein Hochdruckverfahren und nachträglicher Sterilisation durch Erhitzen. Durch die Einbringung solch hoher Energiedichten können Partikel mit durchschnittlichen Größen zwischen 100 und 200 nm erzeugt werden, die von einer monomolekularen Phospholipidschicht umhüllt und stabilisiert werden.^{40, 56, 62}

2.1.2.2 Kommerzielle Produkte auf der Basis von PFC-Emulsionen

Die ersten praktischen Untersuchungen zur Eignung von Sauerstoffträgern auf Perfluorcarbonbasis starteten in den 60ern und wurden durch ein Experiment von Leland Clark und Frank Gollan in Gang gesetzt. Sie demonstrierten 1966, dass eine Maus, die für mindestens 10 Minuten vollständig in eine mit Sauerstoff angereicherte Perfluorcarbonlösung eingetaucht wurde, überleben konnte, indem sie die Flüssigkeit einatmete.⁶³ Damit war das öffentliche Interesse geweckt und nur kurze Zeit später, im Jahr 1967, gelang Henry Sloviter und Toshiharu Kamimoto die Präparation der ersten wasser- und blutlöslichen Emulsion von Perfluor(2-*n*-butyltetrahydrofuran) zur Perfusion isolierter Rattengehirne.⁶⁴ Robert Geyer et

al. ergänzten die Versuchsreihe 1968. In einem Tiermodell konnten sie zeigen, dass ein vollständiger Austausch des Blutvolumens gegen eine Emulsion aus Perfluortributylamin grundsätzlich möglich sei. Die transfundierten Ratten hielten sich in einer 90 bis 100 prozentigen Sauerstoffatmosphäre auf und überlebten den Versuch.^{46, 56} Damit waren das Potential und die Effektivität perfluorcarbonhaltiger Emulsionen zur Gewebeoxygenierung unter Beweis gestellt und der Weg für zukünftige Arbeiten geebnet.

Das primäre Ziel des damals noch recht jungfräulichen Forschungsgebiets bestand in der Herausforderung der Präparation stabiler und physiologisch unbedenklicher, wässriger Emulsionen auf Basis von Perfluorcarbonen, die eine angemessene Retentionszeit von ca. 14 bis 21 Tagen und eine geringe, mittlere Tröpfchengröße von unter 200 nm aufweisen sollten.^{61, 65}

Ihre kommerzielle Entwicklung begann Ende der 70er Jahre mit der Vermarktung von Fluosol-DA (später auch Fluosol®), ein Produkt der „1. Generation“ der Green Cross Corporation in Osaka, Japan. Es war das erste und bisher einzige PFC-basierte Sauerstofftherapeutikum, das 1989 durch die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA (Federal Drug Administration) für klinische Anwendungsbereiche zugelassen wurde. Die Indikation bestand in der ergänzenden Maßnahme der Gewebeoxygenierung in der invasiven Kardiologie zur Durchführung perkutaner transluminaler Koronarangioplastien (PTCA) oder auch zur Untersuchung und vorübergehenden Konservierung von Organen und Transplantaten.^{8, 65} Von dem Konzept der intravenösen Fluosol-Applikation zur Sicherstellung des Sauerstofftransports als Blut- bzw. Erythrozytenersatz im Fall eines hämorrhagischen Schocks oder schwerer Blutungsanämie wurde, aufgrund der zu kurzen intravaskulären Verweildauer (Plasmahalbwertszeit ~ 24 h) und der zu geringen Sauerstoffkapazität der Emulsion, wieder abgesehen.

Die Zusammensetzung dieser Emulsion enthielt zwei perfluorierte Wirkstoffe. Neben ungefähr sechs Gewichtsprozent Perfluortripropylamin (PFTPA) machte Perfluordecalin (PFD) mit ca. 14% Gewichtsanteil den Hauptbestandteil der sauerstofftragenden Komponenten aus. Dabei diente das Amin weniger der Aufgabe des Sauerstofftransports als vielmehr der Stabilisierung des Systems. Als Emulgatoren wurden Pluronic F68 (3 Gew.-%), EYPs (0,4 Gew.-%) und Kaliumoleat (0,032 Gew.-%) eingesetzt. Zum Ausgleich des Ionenhaushalts, dem pH-Wert (7,3) und dem osmotischen Druck wurden Mineralsalze und Zucker hinzugegeben. Die Emulsion wurde durch das Verfahren der Hochdruckhomogenisierung unter Verwendung eines Manton-Gaulin-Apparates hergestellt, wobei polydisperse Tröpfchen mit einer durchschnittlichen Größe von ungefähr 200 nm erhalten wurden. Ein wesentlicher Nachteil, im Vergleich zu nachfolgenden Produkten, betrifft den Aufwand bezüglich der Aufbewahrung und des Gebrauchs von Fluosol. Die Stammemulsion, bestehend aus den beiden Perfluor-

carbonen und den Emulgatoren, musste getrennt und tiefgekühlt von den anderen lediglich gekühlten Bestandteilen, den sogenannten zwei Zusatzlösungen, gelagert werden. Zum Einfrieren der Stammemulsion wurden 0,8 Gew.-% Glycerol als Kryoprotektor hinzugesetzt. Das bedeutet, bevor das Produkt seiner Anwendung unterzogen werden konnte, musste die Stammemulsion zunächst vorsichtig und entsprechend langsam aufgetaut und anschließend mit den beiden Zusatzlösungen vermengt werden. Die Infusion der Emulsion musste dann innerhalb der nächsten acht Stunden erfolgen, darüber hinaus war die Gewährleistung der Stabilität sowie eine zielgerichtete Funktionalität nicht mehr garantiert.⁶⁵ Letztlich führten diese, aber auch eine Reihe weiterer Einschränkungen und Schwierigkeiten, wie z.B. das Auftreten begleitender Nebenwirkungen nach der Applikation, die in erster Linie auf die Unverträglichkeit mit dem weniger biokompatiblen Surfactant Pluronic F68 zurückzuführen sind, sowie eine ineffektive, lokal begrenzte Sauerstoffversorgung des Gewebes, Anfang der 90er Jahre zur Einstellung der Produktion von Fluosol. Doch trotz seines eher mäßigen Erfolgs gilt es als Vorreiter auf dem Gebiet injizierbarer Sauerstoffträger und legte eine Messlatte für die darauffolgenden Entwicklungen verbesserter, stabilerer und stärker konzentrierter Rezepturen emulgierter Perfluorcarbone der „2. Generation“.^{34, 56, 61, 62}

Ein fluosolähnliches Produkt, Perftoran[®], hergestellt von der Scientific Productive Company Perftoran, wurde am Institut für theoretische und experimentelle Biophysik der russischen Akademie der Wissenschaften entwickelt. Bei den sauerstofftragenden Komponenten handelt es sich um Perfluordecalin und Perfluor-N-4-(methylcyclohexyl)-piperidin (PFMCP) im Verhältnis 7:3. Die Emulsion wird durch Proxanol P268, ebenfalls ein aus Poly(oxyethylen)-Poly(oxypropylen)-Einheiten aufgebautes Copolymer, stabilisiert. Im Gegensatz zu Pluronic F68 ist es jedoch weniger toxisch und bioverträglicher. Die wässrige Grundlage bildet auch hier eine physiologische Salzlösung. Ein wichtiger Unterschied besteht in der deutlich leichteren Handhabung und Aufbewahrung von Perftoran im Vergleich zu Fluosol. Es kann bis zu drei Jahre bei Temperaturen zwischen -4 und -18°C und bis zu zwei Wochen bei 4°C gelagert werden und ist ein „ready-for-use“-Produkt. Die durchschnittlichen Tröpfchengrößen liegen bei 60 bis 70 nm. Die geringere Partikelgröße führt zu einer Reduzierung unerwünschter Nebenreaktionen wie z.B. grippeähnlicher Symptome, die bei der Applikation von Fluosol beobachtet werden konnten. Perftoran erhielt 1996 in Russland zur Einsparung von Fremdbluttransfusionen die Zulassung für den perioperativen Einsatz. Seither wurde ein breites Anwendungsspektrum ausgetestet, das sich gegenwärtig auf die Sauerstoffversorgung bei kritischer Gewebeischämie und koronaren Herzkrankheiten beschränkt.^{25, 66, 67}

Ein weiteres bekanntes Präparat ist Oxygent[™] (Perflubron-Emulsion) der Alliance Pharmaceutical Corporation, San Diego, CA. Dabei handelt es sich um ein Produkt der „2. Generation“ und ist per Definition konzentrierter und stabiler als Fluosol oder Perftoran, die

Produkte der „1. Generation“. Oxygent besteht aus einer 60%igen Perflubron-Emulsion (Perfluorooctylbromid, PFOB) mit einem geringen Anteil der schwereren und leicht lipophilen Verbindung Perflubrodec (Perfluordecylbromid, PFDB) zur Stabilisierung von Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe von 160 bis 180 nm. Gleichzeitig soll dadurch einer verlängerten Organ-Retentionszeit entgegengewirkt werden; die Halbwertszeit der PFC-Elimination lässt sich in Folge dessen auf bis zu vier Tage verkürzen. Im Vergleich zu Fluosol und Perftoran sind der PFC-Gehalt sowie die Kapazität zur Sauerstoffaufnahme in Oxygent fast drei- bis viermal höher, so dass bei einem Sauerstoffpartialdruck von 1 atm 17 bis 25 Vol.-% Sauerstoff gelöst werden können. Die kontinuierliche Phase wird aus einer phosphatgepufferten Elektrolytlösung (pH = 7.0 bis 7.2) gebildet. Zur Stabilisierung der dispersen Phase wird ein Surfactant auf der Basis von Eigelblecithinen verwendet, so dass Sterilisationstemperaturen von über 120 °C möglich sind.^{8, 56, 60, 68} Als positive Konsequenz der Biokompatibilität des gewählten Emulgatorsystems konnten in tierexperimentellen Untersuchungen weder eine Aktivierung des Komplementsystems noch immunogene und allergene Reaktionen nachgewiesen werden. Zudem blieben negative Effekte auf die Mikrozirkulation aus. Humanexperimentell zeigten sich weder außergewöhnliche Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung des Blutes oder des Blutbildes, noch traten Unregelmäßigkeiten bei der Überprüfung der Organfunktionen auf. In einigen Fällen wurden nach der Applikation unerwünschte Begleiterscheinungen in Form von grippeähnlichen Symptomen oder leichter Thrombopenie beobachtet, die jedoch innerhalb der Toleranzen normalisiert werden konnten.⁸ Die Haltbarkeitshöchstdauer von Oxygent beträgt bei Kühlungstemperaturen zwischen 2 und 8 °C 24 Monate, bei Raumtemperatur ist eine Aufbewahrungszeit von einigen Wochen möglich. In Analogie zu Perftoran handelt es sich um ein Einkomponentenprodukt und ist sofort gebrauchsfertig.⁶⁸

Im Jahr 2000 verkündete Alliance Pharmaceutical die Patentierung des Verfahrens der A-ANH (Augmented Acute Normovolemic Hemodilution) auf Basis der Ergebnisse einer europäischen Phase-III-Studie zur Verwendung von Oxygent als (fremd)blutsparende Maßnahme bei moderaten oder blutverlustreichen Operationen. Dabei kann die Emulsion im Fall intraoperativ auftretender Blutung in Form einer niedrig dosierten Bolusapplikation perioperativ als transienter Sauerstoffträger eingesetzt werden. In Kombination mit einer präoperativen Eigenblutgewinnung als möglicher autologer Erythrozytenersatz für phagozytierte Emulsionspartikel und unter der Voraussetzung hyperoxischer Beatmung und Intubation für eine maximale Sauerstoffbeladung ist eine intraoperative normovolämische Hämodilution in sehr weitem Ausmaß, unter Ausschluss der Gefährdung durch lebensbedrohliche Komplikationen, für den Patienten möglich. Die Retransfusion des zuvor entnommenen Erythrozytenvolumens ist erst nach erfolgter Blutungsstillung erforderlich, so dass der Verlust autologen Blutes in Folge eines chirurgischen Eingriffs gering gehalten werden kann.^{25, 60, 61}

Doch trotz einer optimierten Rezeptur und ersten zufriedenstellenden Ergebnissen begonnener Phase I und II klinischer Studien bezüglich der Sicherheit und Effektivität von Oxygent sorgten zunehmende neurologische Komplikationen bei der Durchführung klinischer Phase-III-Studien bei kardiochirurgischen Patienten zur vorläufigen Einstellung der Untersuchungen. Sie wurden aber inzwischen von der Firma Double-Crane Pharmaceutical in China wiederaufgenommen und erscheinen zuversichtlich.^{34, 56, 61, 69}

Eine ähnliche Formulierung stellt Oxyfluor[®] dar, ein weiteres vielversprechendes Produkt der „2. Generation“ der Firma HemaGen, St. Louis, MO in Partnerschaft mit Baxter International. Wie Oxygent weist auch Oxyfluor eine signifikant höhere Sauerstoffkapazität als Fluosol-DA auf. Seine Entwicklung geht auf die frühen Arbeiten von L. Clark zurück. Im Gegensatz zu anderen finanzierten Forschungsvorhaben lag das Hauptaugenmerk hier zunächst auf der Auswahl *eines* optimalen Perfluorcarbons, so dass viel Arbeit und viel Zeit investiert wurden, um das Perfluorcarbon zu finden, das allen Ansprüchen gerecht werden konnte und den Zusatz weiterer stabilisierender perfluorierter Verbindungen unnötig macht. Mit Perfluor-1,8-dichloroctan (PFDCO) scheint HemaGen die passende Verbindung gefunden zu haben, was auch die Resultate der ersten klinischen Tests der Phase I und II belegen. Die durchschnittliche Partikelgröße liegt zwischen 220 und 250 nm, stabilisiert durch Eigelblecithine. Mit Ausnahme des gelegentlichen Erscheinens einer grippeähnlichen Symptomatik und leichter Thrombopenie – vergleichbar mit den Nebenwirkungen von Oxygent – wurden keine schwerwiegenden nachteiligen Effekte nach der Indikation von Oxyfluor nachgewiesen. Darüber hinaus verfügt Oxyfluor derzeit als einzige Perfluorcarbonemulsion über eine ausreichende Stabilität, die eine einjährige Lagerung ohne die Notwendigkeit tieferer Temperaturen möglich macht. Somit wäre zugleich eine Verwendung außerhalb von Krankenhäusern oder entsprechenden Einrichtungen realisierbar. Da HemGen aber lediglich ein kleines Unternehmen ist, ist es auf externe finanzielle Unterstützung oder Kooperationen angewiesen, so dass weitere und zukünftige Entwicklungen bzw. klinische Studien nur langsam vorangetrieben werden können.^{10, 56, 60}

Im Zuge einer Optimierung der Emulsionsstabilität verspricht man sich seit kurzem über die Einführung zusammengesetzter heterogener Fluorcarbon-Hydrocarbon-Diblockverbindungen (z.B. F_6H_{10}) als ergänzende PFC-lösliche Komponente neben den biokompatiblen Phospholipiden eine höhere Resistenz der Emulsionströpfchen gegenüber Ostwaldreifung. Dies ist ein Prozess, der zur Destabilisierung des Systems führen kann (siehe Kapitel 2.2.2.2). Den Sauerstoffträger bildet Perfluorooctylbromid, das bereits in Form von Oxygent aussichtsreiche Resultate erzielen konnte. Durch den Einbau fluorierter Blockelemente kommt es, abgesehen von einer Verringerung der Wasserlöslichkeit, zu einem enormen Abfall der Grenzflächenspannung zwischen der Perfluorcarbon- und der wässrigen Phospholipidphase. Zudem

besitzen die Diblockverbindungen den Vorteil, dass sie, aufgrund ihrer Lipophilie sehr schnell ausgeschieden werden, wobei hohe Konzentrationen ohne eine Gefährdung durch toxische Effekte eingesetzt werden können.⁵⁶

Zusammenfassend werden die wichtigsten Informationen über PFC-basierte Blutersatzstoffe bzw. O₂-Träger in der nachfolgenden Tabelle 2.3 nochmals aufgeführt. Ergänzend sind in Tabelle 2.4 die oben beschriebenen kommerziellen Produkte aus PFC-Basis aufgelistet.

Tabelle 2.3: Zusammenfassung wichtiger Fakten III

Blutersatz bzw. O₂-Träger auf Basis von Perfluorcarbonen

Vorteile PFC gegenüber Hämoglobin	<ul style="list-style-type: none"> - unabhängig von biologischen Produktionsquellen oder Vorräten - potentiell uneingeschränkter + verlässlicher Zugriff auf das Rohmaterial - geringeres Übertragungsrisiko von pathogenen Mikroorganismen oder infektiösen Viren - keine chemische Modifizierung notwendig
Schwierigkeit PFC	<ul style="list-style-type: none"> - geringe Mischbarkeit mit Wasser bzw. Blut bzw. Blutplasma → Emulgierung von PFCs in wässriger Lösung
Bedingungen an PFC-Emulsionen	<ul style="list-style-type: none"> - angemessene Retentionszeit - spezifische Tröpfchengröße/Monodispersität - stabil - hochkonzentriert + fluide - geeigneter Emulgator - reproduzierbar - physiologisch unbedenklich/keine Nebenwirkungen - steril

Tabelle 2.4: Übersicht über kommerzielle Sauerstoffträger auf Basis von Perfluorcarbonemulsionen

Produkte auf PFC-Basis

Fluosol [®] , Green Cross Corporation, 1. Generation	
O ₂ -Träger	14 % Perfluordecalin, 6 % Perfluortripopylamin
Ø Tröpfchen	~ 200 nm
Indikation	Organkonservierung, Krebstherapie, Gewebeoxygenierung
Klinische Prüfphase	Zulassung in Großbritannien und Europa 1990; gestoppt
Problematik	geringe Stabilität, geringe Lagerfähigkeit, geringe Persistenz im Blut
Perftoran [®] , Scientific Productive Company Perftoran, 1. Generation	
O ₂ -Träger	7 % Perfluordecalin, 3 % Perfluor-N-4-(methylcyclohexyl)-piperidin
Ø Tröpfchen	60 bis 70 nm
Indikation	perioperativer Einsatz, Reduktion von Fremdbluttransfusion
Klinische Prüfphase	Zulassung in Russland 1996
Problematik	unbekannt
Oxygent [™] , Alliance Pharmaceutical Corporation, 2. Generation	
O ₂ -Träger	60%ige Perflubron-Emulsion (Perfluorooctylbromid + -decylbromid)
Ø Tröpfchen	160 bis 180 nm
Indikation	Reduktion von Fremdbluttransfusion, präoperative Hämodilution
Klinische Prüfphase	Phase III in Europa, unterbrochen
Problematik	grippeähnliche Symptomatik, transiente Thrombopenie
Oxyfluor [®] , HemaGen & Baxter International, 2. Generation	
O ₂ -Träger	40 % Perfluordichloroctan
Ø Tröpfchen	220 bis 250 nm
Indikation	Reduktion von Gasembolie während Herz-Lungen-Maschine
Klinische Prüfphase	Phase I, unterbrochen
Problematik	grippeähnliche Symptomatik, Thrombopenie

Wenn auch derzeitig noch kein künstliches Produkt jeglichen gestellten Anforderungen entspricht und die Anwendung perfluorcarbonhaltiger Emulsionen bisher lediglich in einer überbrückenden und unterstützenden Maßnahme besteht, so ist doch klar zu erkennen, welches gewaltige Potenzial in der Weiterentwicklung perfluorierter Materialien für den medizinisch-biologisch und pharmazeutischen Bereich sowie darüber hinaus steckt. Die Kombination aus erhöhter Hydrophobie und hohem Dampfdruck macht man sich beispielsweise bei der Präparation injizierbarer wässriger Dispersionen von perfluorcarbongefüllten Mikroblasen als *in vivo* Reflektoren für die kontrastmittelverstärkte Ultraschallanwendung in der Diagnostik zu nutze. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit verbleibt die fluorierte Verbindung innerhalb der Gasbläschen und sorgt für einen Ausgleich zwischen Blutdruck und Oberflächenspannung, so dass ein schnelles Auflösen der Blasen im Blut verhindert wird. Weitere Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich auf dem Gebiet der Augenheilkunde, bei der Flüssigkeitsbeatmung von Neugeborenen zur Behandlung pulmonaler Funktionsstörungen oder in Form von Gelen oder Mikroemulsionen als Schmierstoffe oder als Polsterung bei Gelenkerkrankungen wie Arthrose und rheumatoider Arthritis. Außerklinisch werden die einzigartigen Eigenschaften hochfluorierter Verbindungen vor allem im Bereich des Korrosionsschutzes, als Antifrikations- und Flammenschutzmittel und zur Hydrophobisierung für Beschichtungen, in der Polymertechnologie oder der Metallverarbeitung genutzt. Große Bedeutung wird auch der Fähigkeit fluorierter Amphiphile zur Selbstorganisation neuer mikro- oder nanometergroßer molekularer Strukturen wie Filmen, Membranen oder Vesikeln beigemessen.^{8, 40, 42, 56, 58,}

59, 70

2.2 Kolloidale Trägersysteme

2.2.1 Kolloide

Die Intention dieses Kapitel, mit einer allumfassenden und gleichzeitig allgemeingültigen Definition des Begriffes „Kolloid“ bzw. „Kolloidales System“ zu beginnen, erweist sich als unerwartet kompliziert und hinsichtlich der Eindeutigkeit ihrer Aussage als äußerst unbefriedigend. Dabei zieht der Mensch schon seit Jahrhunderten mehr oder weniger unwissentlich seinen Nutzen aus den Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten kolloidaler Materialien.⁷¹ Trotzdem entwickelte sich die Kolloidwissenschaft als eigenständiges Forschungsgebiet der Physikalischen Chemie erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts und vernetzt, aufgrund ihrer mannigfaltigen und fachübergreifenden Inhalte, zum aktuellen Zeitpunkt Naturwissenschaftler unterschiedlichster Qualifikationen und Disziplinen, wie beispielsweise Physiker, Mediziner, Biologen, Pharmazeuten, Geologen und natürlich Chemiker, miteinander.⁷² Ihre Namensprägung sowie die Gründung der Kolloidchemie werden auf den Wissenschaftler Thomas Graham zurückgeführt, der Mitte des 19. Jahrhunderts das Diffusionsverhalten verschiedener Substanzen an tierischen Membranen untersuchte und ihre Differenzierung in Kristalloide und Kolloide vornahm.⁷³ Nachdem er beobachtete, dass kleinere Ionen sehr wohl, größere Biopolymere wie Leim oder Dextrin jedoch nicht imstande waren zu permeieren, schlussfolgerte er die Existenz von Makromolekülen und schuf mit dem Terminus Kolloid (von griechisch kolla = Leim und eidos = Form) eine Abgrenzung zu den ihm bereits bekannten, kleineren Kristalloiden.⁷⁴ Die größenspezifische Eingliederung kolloider Stoffe in das bestehende Ordnungssystem erfolgte als unpräzise definierte, mesoskopische Übergangszone zwischen zwei Extremen – der Abmessung einzelner Moleküle oder Atome und der makroskopischer Festkörperstrukturen. Aufgrund des relativ breit gesteckten Größenbereichs stellten die Erforschung und die Aufklärung des kolloidalen Materialcharakters ungerechtfertigter Weise lange Zeit eine unangenehme bzw. aufwendige Herausforderung dar, wie es Wolfgang Ostwald 1914 mit seinem Werk *„Die Welt der vernachlässigten Dimensionen“* als „Propagandaschrift für die Kolloidchemie“ zum Ausdruck brachte.⁷⁵ Trotz des ihr schon damals zugeschriebenen großen Verwendungspotentials dauerte es noch einige Jahre, bis das allgemeine Interesse stieg und die Entwicklung der Grenzflächen- und Kolloidchemie in der Wissenschaft ihre Berechtigung fand.

Nach dem heutigen Kenntnisstand beschreibt das klassische kolloidale System Dispersionen von kleinen, festen Partikeln in einem in der Regel wässrigen Medium oder einer Lösung.⁷⁶ Im erweiterten Sinne kann es sich bei der dispersen Phase auch um ein Gas oder eine Flüssigkeit handeln, die in der äußeren Phase, dem kontinuierlichen Medium (Feststoff, Flüssigkeit, Gas), in fein verteilter Form vorliegt. Daraus ergibt sich eine Vielfalt an Kombinationen, typisiert durch die Natur der dispersen und kontinuierlichen Phasen des Systems, die allge-

mein in Aerosole (Feststoff oder Flüssigkeit in einem Gas oder Gasgemisch), Emulsionen (Flüssigkeit in Flüssigkeit) und Suspensionen bzw. kolloidale Dispersionen (Feststoff in Flüssigkeit) differenziert werden können. Gängige Beispiele dafür sind Rauch oder Nebel, Milch und Farben oder Lacke. Reverse Kombinationsmodelle ergeben sich durch die Dispersion eines Gases in einem Feststoff oder einer Flüssigkeit, die allgemein als Schäume bezeichnet werden. Des Weiteren wird unter dem Begriff Sol die feine Zerteilung eines Feststoffs in einem anderen Feststoff verstanden, wie es beispielsweise bei bestimmten Gläsern oder Salzen der Fall ist.^{72, 76, 77} Im Gegensatz zu echten homogenen, molekulardispersen Lösungen sind die Einheiten auf kolloidaler Ebene, bestehend aus 10^3 bis 10^9 Atomen, deutlich größer und bewegen sich unter der Annahme einer kugelförmigen, sphärischen Teilchengestalt in Dimensionen zwischen 1 und 1000 Nanometern im Durchmesser.⁷⁸ Nach einem Vorschlag der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) von 1971 muss die Ausdehnung der Teilchen in mindestens einer Richtung den besagten Größenbereich abdecken, um der Gruppe der Kolloide zugeordnet werden zu können.⁷⁹ Abgesehen von der größenspezifischen Segmentierung ist es aber vor allem die Charakterisierung des Zustandes, vielmehr des „Zerteilungszustandes“ solch eines Systems, der per Definition ausschlaggebend für die Beschreibung eines Kolloids ist und für die weitreichende Bedeutung kolloidchemischer Phänomene und ober- oder grenzflächenbezogener Effekte verantwortlich gemacht werden muss.⁷³

Neben der Klassifizierung anhand des Aggregatzustandes ist zudem die Einteilung kolloidaler Systeme nach Hermann Staudinger eine geläufige Methode, die die Bindungsart zwischen den Atomen der Teilchen berücksichtigt und infolge thermodynamischer und struktureller Eigenschaften eine Unterscheidung in Dispersions-, Molekül- und Assoziationskolloide vornimmt. Erstere sind thermodynamisch instabile und zumeist polydisperse Systeme aus lyophoben Kolloiden (siehe Abbildung 2.5b). Ihre Stabilisierung erfolgt im Wesentlichen durch repulsive Kräfte aufgrund einer gegebenen Ladungsverteilung um das kolloide Partikel oder durch die Abstoßung individueller Teilchen mit Hilfe aufgetragener Adsorptionsschichten. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Assoziationskolloiden – auch Mizellkolloide genannt – um thermodynamisch stabile, lyophile Systeme aus sogenannten selbstorganisierenden Assoziaten oder Aggregaten einzelner amphiphiler Tensidmoleküle innerhalb eines spontan und reversibel ablaufenden Prozesses (siehe Abbildung 2.5a). Je nach Polarität der kontinuierlichen Phase ist die Bildung „normaler“ oder „inverser“ Mizellen unterschiedlicher Morphologie und Größe in Abhängigkeit weiterer Faktoren, wie z.B. der chemischen Zusammensetzung des Tensids, seiner Konzentration (kritische Mizellbildungskonzentration) oder der Temperatur etc. möglich. Liegt hingegen eine makromolekulare, polymere Lösung vor, spricht man von Molekülkolloiden (siehe Abbildung 2.5c). Sie sind ebenfalls thermodynamisch stabil. Die kolloide Dimension wird durch die statistische Knäuelung der Polymer-

ketten vorgegeben und kann bedingt durch den Polymerisationsgrad der Makromoleküle eine polydisperse Verteilung aufweisen.⁷²

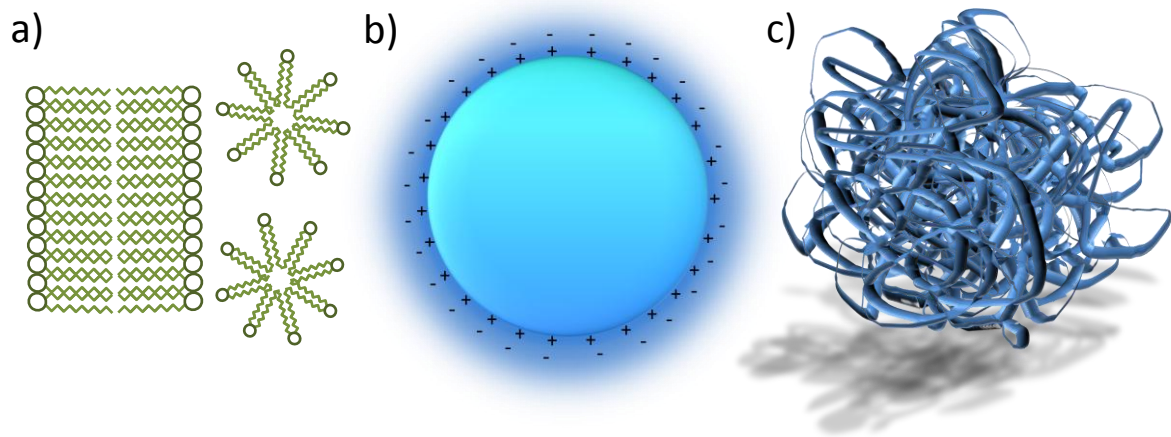


Abbildung 2.5: Strukturschemata zur Einteilung kolloider Systeme nach H. Staudinger: a) Assoziationskolloid (Mizellkolloid), b) Dispersionskolloid, c) Molekülkolloid (nach [72]).

Als eine nachträgliche bzw. zusätzliche Kolloidklasse können Netzwerkkolloide angesehen werden. Sie bestehen aus zwei sich gegenseitig durchdringenden Netzwerken, wobei die Differenzierung in kontinuierliche und disperse Phase nicht eindeutig verläuft.⁷⁶

Realistisch betrachtet ist eine eindeutige Zuordnung kolloidaler Systeme natürlich in vielen Fällen aufgrund ihrer Komplexität, hinsichtlich der Vielfalt kolloidaler Typen und einer möglichen Überlagerung ihrerseits nach dem oben aufgeführten Muster nicht immer durchführbar. Kolloidale Systeme dieser Art werden dann einfach als komplexe oder multiple Kolloide bezeichnet.⁷⁶

2.2.1.1 Stabilität kolloidaler Systeme

Aufgrund des besonderen Verhältnisses von Oberflächen- zu Volumenatomen/-molekülen spielen in kolloidalen Systemen Oberflächen- respektive Grenzflächenreaktionen eine signifikante Rolle und führen zu kolloidspezifischen Eigenschaften gegenüber hoch- und grobdispersen Modellen. Diese werden umso dominanter, je kleiner die partikulären Einheiten und je größer die entsprechende Grenzfläche oder besser gesagt die entsprechende Grenzflächenphase zwischen der dispersen und der kontinuierlichen Komponente werden. Zugleich bewirkt der Zerkleinerungsprozess eine Erhöhung der Grenzflächenenergie pro Volumeneinheit. Aus thermodynamischer Sicht wird jedoch jedes System, sobald es sich selbst überlassen wird, versuchen einen Zustand minimaler Freier Energie zu erreichen. Dies gelingt im Fall von kolloidalen Dispersionen, indem sie ihre im Verhältnis zum Volumen größere Ober-

fläche verringern und so eine Phasentrennung herbeiführen. Die Instabilität ergibt sich aus der Beziehung für die Freie Energie

$$dG = \gamma d\sigma \quad (2),$$

wobei γ die Oberflächenspannung und $d\sigma$ die Änderung der Oberfläche beschreiben. Eine Verkleinerung der Oberfläche ($d\sigma < 0$) bedeutet demnach eine Abnahme der Freien Energie ($dG < 0$). Infolge dessen ist eine Minimierung der Oberfläche thermodynamisch begünstigt und läuft spontan ab.^{72, 80}

Unter Berücksichtigung kinetischer Aspekte stellen kolloide Systeme im Regelfall einen metastabilen Zustand dar. Die beschriebenen Grenzflächenkräfte zwingen sie in eine energetisch ungünstige Situation. Der Übergang in einen energetisch günstigeren und stabileren Zustand wird jedoch durch eine Energiebarriere verhindert bzw. erschwert. Die Energie, die zur Überwindung dieser Barriere aufgebracht werden muss, kann durch zufällige Stöße zwischen den kolloidalen Partikeln und den Molekülen des Dispersionsmediums als Folge der Brownschen Teilchenbewegung gewonnen werden. Die pro Partikelkollision potenzielle Energieübertragung verläuft entsprechend der Maxwell-Boltzmann-Verteilung und beträgt im Mittel $3/2 kT$ (mit k = Boltzmannkonstante und T = Temperatur).⁷⁶

Mit dem Übergang in den stabileren Zustand geht zumeist eine Entmischung, also eine Zerstörung des kolloidalen Systems, einher. Interpartikuläre Wechselwirkungskräfte führen bei entsprechend kleinen Partikelabständen zu einer Anziehung individueller, kolloider Teilchen und können letztlich den „irreversiblen“ Prozess der Koagulation, also eine Zusammenlagerung (Aggregation) der Partikel innerhalb einer festen, dichten Struktur, hervorrufen. Das Resultat ist eine Phasentrennung, erkennbar aufgrund von Sedimentation oder Aufrahmen der dispergierten Phase in Abhängigkeit von ihrer Dichte. Der dispergierte Zustand ist aufgehoben und kann ohne einen erheblichen Energie- bzw. Arbeitseintrag nicht wieder hergestellt werden. Kommt es dagegen lediglich zu einer lockeren Zusammenlagerung der Teilchen, spricht man von einer Flockung des Systems. Sie verläuft im Normalfall reversibel, so dass die Rückkehr in den dispersen Zustand schon mit Hilfe eines relativ geringen Energieaufwands realisiert werden kann.⁷⁶

Die durch Kollision verursachte Zusammenlagerung mehrerer Partikel zu größeren Verbänden bzw. Agglomeraten kann prinzipiell mittels zweier wesentlichen Stabilisierungsmechanismen gestört werden. Man unterscheidet zwischen elektrostatischer und sterischer Stabilisierung.

Elektrostatische Stabilisierung (DLVO-Theorie)

Voraussetzung für die Fähigkeit eines kolloidalen Systems zur elektrostatischen Stabilisierung ist die Existenz von elektrischen Ladungen an der Oberfläche der Partikel, die in einem flüssigen dispersen Medium im Allgemeinen als gegeben angenommen werden kann. Diese Oberflächenladungen werden durch Gegenionen aus dem Medium kompensiert, so dass sich eine sogenannte elektrische Doppelschicht um jedes kolloidale Teilchen ausbildet. Hierbei wird zwischen einer inneren, unbeweglichen Ionenschicht (Stern-Schicht) und einer äußeren diffusen, entgegengesetzt geladenen Atmosphäre, die als Gouy-Chapman-Schicht bezeichnet wird, unterschieden (siehe Abbildung 2.6). Die Stabilisierung ergibt sich durch die Abstoßung der elektrisch äquivalenten diffusen Ionenschichten der einzelnen Teilchen.⁷²

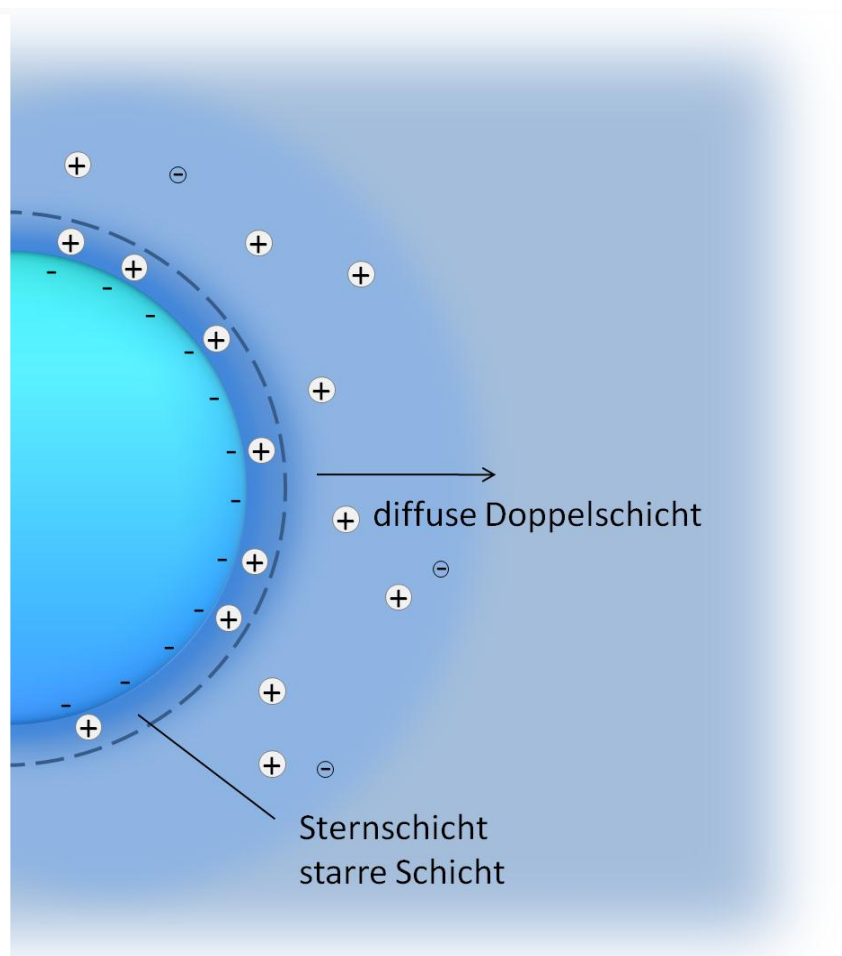


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht am Beispiel eines kolloidalen Partikels.

Mit Hilfe der DLVO-Theorie^f lassen sich die interkolloidalen Wechselwirkungen quantitativ beschreiben. Sie geht davon aus, dass sich die abstoßenden Kräfte (V_R) zwischen den Ladungen der elektrischen Doppelschicht benachbarter Teilchen und die anziehenden Kräfte (V_A) aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkungen der Moleküle in den Teilchen gerade

^f nach Boris V. Derjaguin, Lew D. Landau, Evert J. W. Verwey und Jan T. G. Overbeck

ausgleichen. Die Gesamtenergie (V_T) ergibt sich dabei aus der Summe aller abstoßenden und anziehenden Kräfte und ist vom Abstand d_A zwischen den Teilchen abhängig:

$$V_T = V_A + V_R \quad (3).$$

Dieser Sachverhalt lässt sich graphisch mittels des Lennard-Jones-Potentials veranschaulichen (siehe Abbildung 2.7).

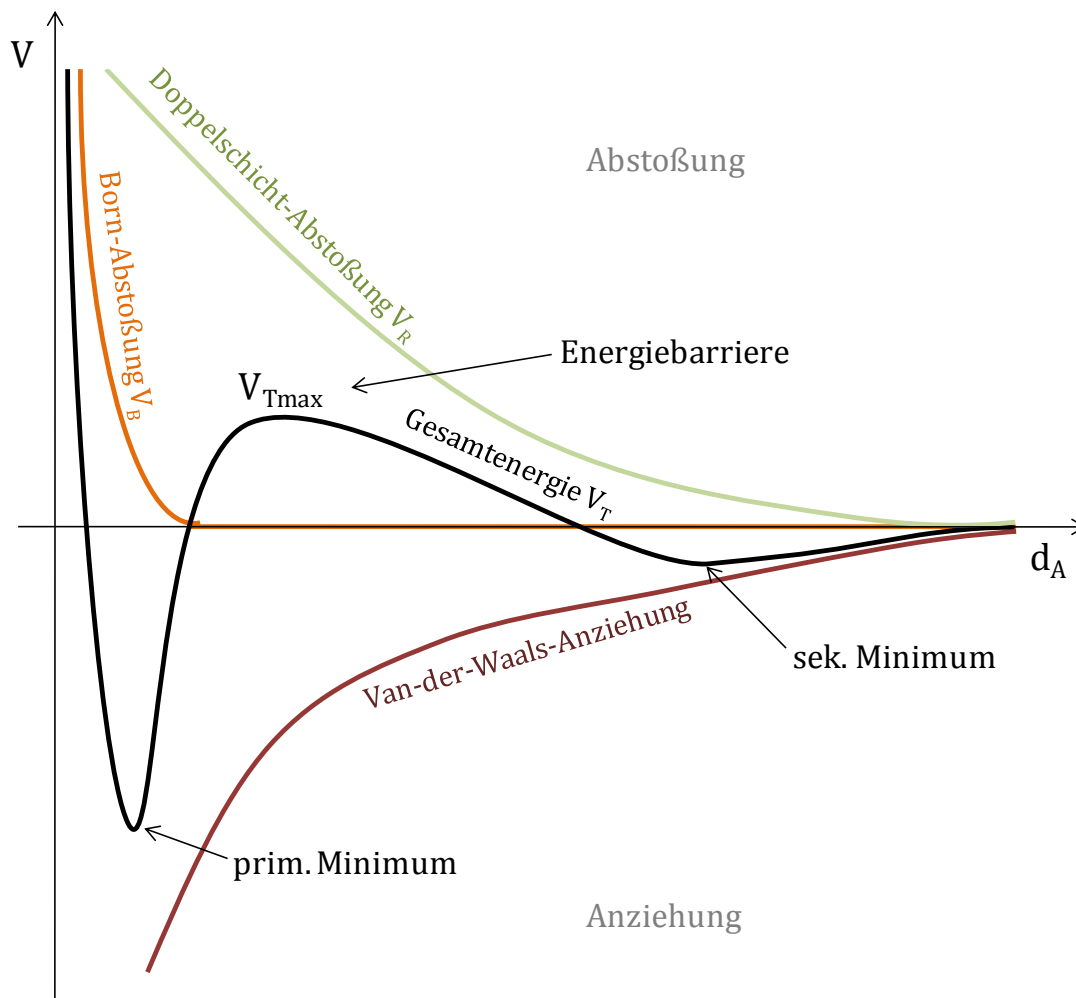


Abbildung 2.7: Verlauf der potentiellen Energie V als Funktion des Abstandes zwischen zwei Partikeln. Die Gesamtenergie resultiert aus additiver Überlagerung von Abstoßungs- und Anziehungskräften.

Bei sehr großen Partikelabständen überwiegt die elektrostatische Abstoßungsenergie V_R und steigt zunächst mit zunehmender Annäherung der Teilchen an. Sie ist von der Dicke der elektrochemischen Doppelschicht abhängig und folgt der Beziehung:

$$V_R = ze\Psi_0 \exp(-\kappa d_A) \quad (4).$$

z ist die Zahl der Elementarladungen und e die Elementarladung. Ψ_0 entspricht dem Potential der Doppelschicht, κ dem Debye-Hückel-Parameter, d_A beschreibt den Abstand zwischen

den Teilchen. Gleichzeitig nimmt bei kürzerer Entfernung der Einfluss der attraktiven Van-der-Waals-Wechselwirkungen V_A zu, was näherungsweise mit Hilfe von Gleichung 5

$$V_A = \frac{-Hr}{12d_A} \quad (5)$$

ausgedrückt werden kann. H steht hier für die Hamaker-Konstante, r ist der Partikelradius.

Ab einer bestimmten Annäherungsdistanz übersteigt der numerische Wert der Van-der-Waals-Anziehung den des Abstoßungspotentials, was dazu führt, dass das Potentialmaximum in Richtung kleinerer Partikelabstände steil abfällt und die resultierende Gesamtenergie negative Werte annimmt, da die kürzerreichenden Anziehungsenergien überwiegen. Besteht für die Partikel die Möglichkeit die Energiebarriere (V_{Tmax}) zu überwinden, kommt es durch einen direkten Kontakt zwischen den Teilchen zu einer irreversiblen Koagulation. Dabei wird die Born'sche Abstoßungsenergie (V_B) wirksam und führt zur Bildung des tiefliegenden sogenannten primären Minimums. An dieser Stelle ist eine Redispergierung der Partikel nur noch eingeschränkt und mittels sehr hoher Energieeinträge möglich.

Die Höhe der Energiebarriere ist von der Größe der repulsiven Kräfte abhängig und wird somit durch die Dicke der elektrischen Doppelschicht der Partikel beeinflusst. Die äußere, diffuse Ionenschicht kann durch Zugabe von Elektrolyten oder Salzen komprimiert werden, so dass anziehende Wechselwirkungen vorherrschen und diese im Vergleich zur Abstoßung einen größeren Beitrag zur Gesamtenergie leisten können. Erreicht das Potentialmaximum einen ausreichend niedrigen Wert, ist die Dispersion nicht mehr stabil und koaguliert. Die notwendige Salz- oder Elektrolytkonzentration wird kritische Koagulations- oder auch Flockungskonzentration genannt.

Existiert zwischen den Teilchen keine Energiebarriere mehr, führt jeder Zusammenstoß zur Aggregation und man spricht von einer schnellen Koagulation. Ist die Energiebarriere dagegen ausreichend hoch, ist eine elektrostatische Stabilisierung gegeben und der disperse Zustand bleibt erhalten. Optional kann sich bei einem relativ großen Partikelabstand ein flaches, sekundäres Potentialminimum ausbilden, welches bei einer bestimmten Entfernung zwischen den Ionenwolken der Teilchen durch einen leichten Überschuss kohäsiver gegenüber repulsiver Kräfte hervorgerufen wird. Dadurch wird zwar eine lockere Zusammenlagerung der Teilchen begünstigt, sie verläuft jedoch reversibel, d.h. die Partikel können durch relativ geringe Energieeinträge wieder voneinander getrennt und redispergiert werden.^{72, 73, 76}

Sterische Stabilisierung

Einen weiteren Stabilisierungsmechanismus stellt die sterisch oder auch entropisch bedingte Abstoßung kolloider Partikel dar. Als Hilfsmittel dienen protektive Stabilisatormoleküle, die an

der Oberfläche der Teilchen adsorbiert werden und eine Aggregation durch entropische oder osmotische Effekte verhindern. Als äußerst effektiv erweisen sich Polymere oder Makromoleküle, wobei die Wirksamkeit und die Ausdehnung der adsorbierten Schutzschicht stark von ihrer Konformationsänderung während des Adsorptionsvorganges abhängen. Einen möglichen Vorteil bieten Stabilisatoren mit unterschiedlich affinen Kettensegmenten, so dass sich neben Molekülen, die nur flach auf der Substratoberfläche aufliegen können (trains, siehe Abbildung 2.8a), auch sogenannte Schwänze (tails, siehe Abbildung 2.8b) und schlaufenartige Strukturen (loops, siehe Abbildung 2.8c) ausbilden, die nicht fest an der Oberfläche verankert sind und so in die Lösung hineinragen können. Die Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Polymer können durch Dipol-Dipol- bzw. Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Effekte oder für Polyelektrolyte zusätzlich durch elektrostatische Anziehung verursacht werden.

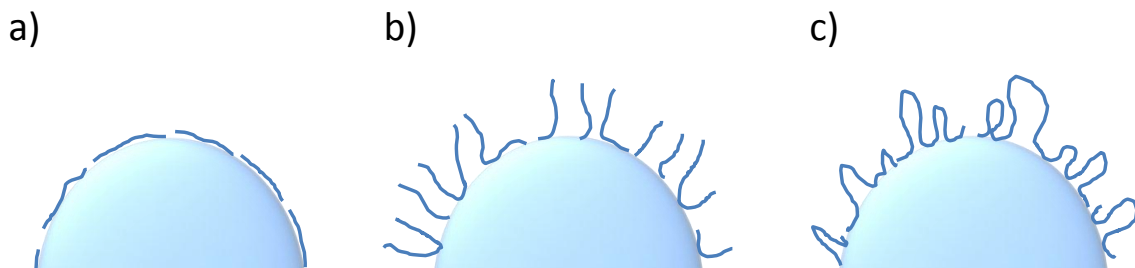


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung möglicher Adsorptionsmuster von Makromolekülen an einer kolloidalen Oberfläche: a) flachadsorbierende Segmentbereiche (trains), b) terminale oder zentrale Anhaftung (tails), c) Schlaufen (loops).

Die Stabilisierung ergibt sich aus der Blockierung der Interpenetration zweier sich annähernder Kolloidteilchen infolge einer gegenseitigen Verschränkung ihrer adsorbierten Polymerschichten (siehe Abbildung 2.9). Die abstoßenden Wechselwirkungen lassen sich dabei entweder auf einen osmotischen oder einen entropischen Effekt zurückführen.

Beim osmotischen Effekt kommt es zu einem lokalen Konzentrationsanstieg des Adsorbats im Überlappungsbereich der Schutzschichten benachbarter Teilchen, was eine Desolvation, also eine Verdrängung von Lösemittelmolekülen aus diesem Bereich zur Folge hat. Dadurch entwickelt sich ein osmotischer Druck, der einen Rückfluss der kontinuierlichen Phase bewirkt und die Teilchen wieder auseinanderdrängt.

Der entropische Effekt wird durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Polymerketten für eine entsprechende Konformationsänderung während der Annäherung und Überlappung und somit durch den Verlust von Freiheitsgraden ausgelöst. Dadurch erfährt das System eine Abnahme der Entropie, welcher mittels Partikeltrennung entgegengesteuert wird.

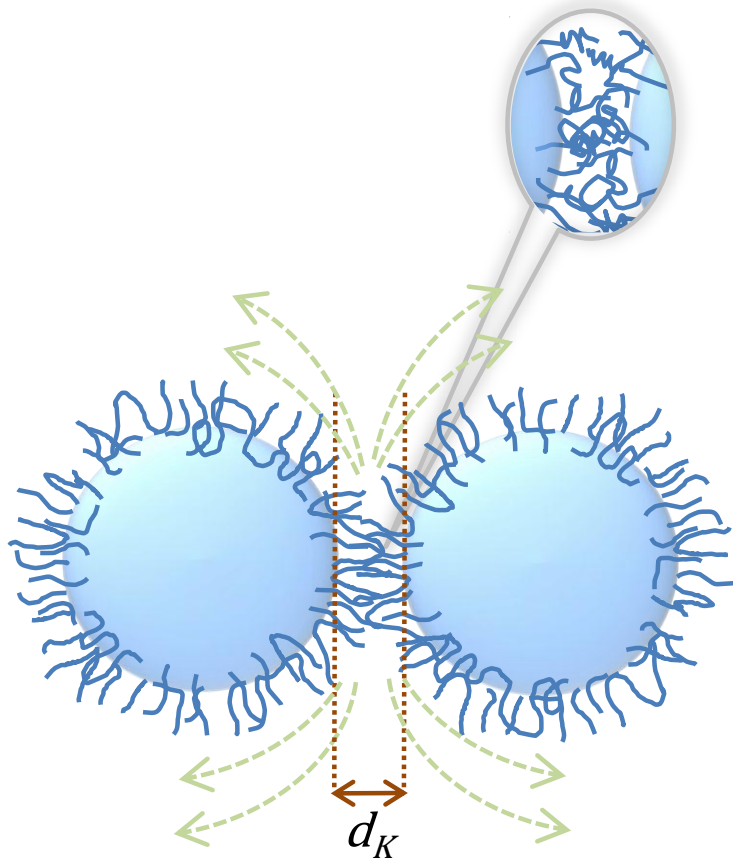


Abbildung 2.9: Sterische Stabilisierung kolloider Partikel durch repulsive Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Makromolekülen. Nähern sich die Partikel auf einen minimalen Abstand d_K einander an, kommt es durch Interpenetration der adsorbierten Molekülketten zu einer gegenseitigen Abstoßung der Partikel (nach [72]).

Bei der sterischen Stabilisierung herrscht demnach ein Gleichgewicht zwischen einer Anziehung bei großer Entfernung aufgrund von Van-der-Waals-Kräften und der Abstoßung benachbarter Teilchen aufgrund sterischer Hinderungen. Als Zusatzinformation ist anzumerken, dass Polymere mit einem höheren Molekulargewicht im Allgemeinen einen besseren Schutz darstellen als niedermolekulare Polymere, da sie aufgrund ihrer längeren Molekülketten eine dickere Schutzschicht ausbilden können. Gleichzeitig besteht jedoch auch das Risiko, dass längere Polymerketten simultan an die Oberflächen verschiedener Partikel adsorbieren und auf diese Weise zu einer Verbrückung und einer Flockung der Kolloide beitragen. Ebenso können nur schlecht oder sehr schwach adsorbierte Polymere eine Aggregation der Partikel hervorrufen, da sie bei einer Annäherung zweier Partikel infolge ihrer lockeren Bindung aus dem Kontaktbereich herausgetrieben werden und sich die ungeschützten Kolloide innerhalb der Reichweite der attraktiven Van-der-Waals Wechselwirkungen gegenseitig anziehen können. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Wahl des Lösemittels bzw. des dispersen Mediums, das einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität eines gegebenen Stabilisator-Kolloid-Systems hat. So kann es zum Beispiel zu einer Verminderung der Adsorptionsstärke des

Polymers auf der Substratoberfläche und damit zu einer Reduzierung der Schichtdicke kommen.^{72, 76}

Im Großen und Ganzen lässt sich die Stabilität eines kolloidalen Systems demnach als ein Wechselspiel von Anziehungs- und Abstoßungskräften verstehen und es gilt, die richtige Balance zur Aufrechterhaltung des Dispersionsgrades unter Berücksichtigung aller relevanten Parameter zu finden. In vielen Fällen ist es sogar notwendig, die Dispersität eines gegebenen Systems mittels beider Mechanismen bzw. durch eine Kombination aus sterischer und elektrostatischer Stabilisierung sowie weiterer Hilfsmittel sicherzustellen.

2.2.2 Emulsionen

Ein interessanter Forschungszweig der Kolloidchemie beschäftigt sich mit der Entwicklung und der Charakterisierung von Emulsionen, Flüssig-Flüssig-Systeme, die im alltäglichen Leben in fast jedem Bereich ihre Anwendung finden. Dabei handelt es sich um heterogene Systeme aus (mindestens) zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen, die entsprechend der in Kapitel 2.2.1 vereinbarten Definition kolloider Stoffe in den Rollen des Dispersums als fein verteilte Tröpfchen und des Dispersionsmittels vorliegen. Die Durchmesser der Tröpfchen liegen oftmals im Bereich von einigen Mikrometern. Obwohl sie damit die Größenordnung kolloidaler Teilchen bei Weitem überschreiten, werden Emulsionen aufgrund anderer verwandter Eigenschaften trotzdem zu der Familie der Kolloide gezählt.^{76, 81}

In den meisten Fällen bestehen Emulsionen aus einer Öl(Kohlenwasserstoff)- und einer wässrigen (polaren, protischen oder aprotischen) Phase. Man differenziert vereinfacht in O/W(Öl-in-Wasser)- und W/O(Wasser-in-Öl)-Systeme, wobei die disperse Phase zuerst genannt wird (siehe Abbildung 2.10). Eine weitere Erscheinungsform stellen multiple Emulsionen mit einer O/W/O- oder W/O/W-Struktur dar.

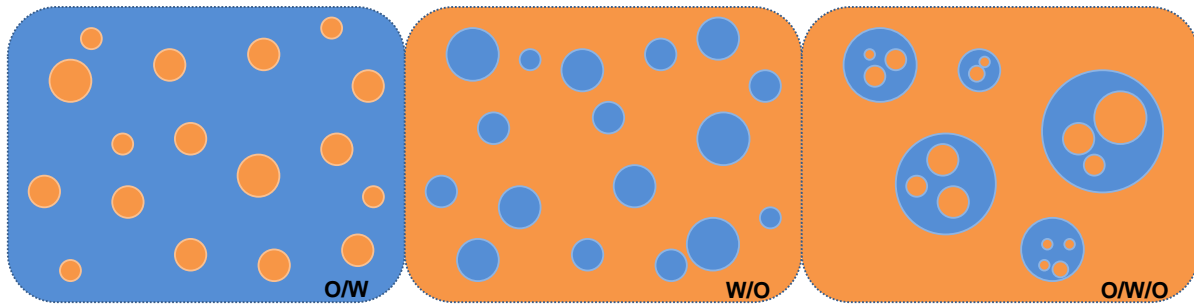


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung verschiedener Emulsionstypen (blau: wässrige Phase, orange: Ölphase). Links: Öl-in-Wasser-Emulsion; Mitte: Wasser-in-Öl-Emulsion; Rechts: Öl-in-Wasser-in-Öl-Emulsion als Beispiel einer Polyphasenemulsion (nach [72]).

Die Phasenlage ist von mehreren Faktoren abhängig und wird unter anderem von dem Volumenverhältnis zwischen Öl und Wasser, der Elektrolytkonzentration der wässrigen Phase oder der Temperatur beeinflusst. Ihre Präparation erfordert oftmals die Aufbringung erheblicher Energieeinträge sowie den Zusatz von Additiven, d.h. Stabilisatoren in Form von Tensiden bzw. amphiphilen Substanzen. Im Besonderen und häufig synonym werden auch die Begriffe Emulgator oder Surfactant (engl. Surface active agent = oberflächen- bzw. grenzflächenaktive Substanz) verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.1). Je nach Löslichkeit des Tensids bildet sich eine der beiden Emulsionstypen (O/W- bzw. W/O-Emulsion) aus, wobei nach der Regel von Wilder D. Bancroft diejenige Komponente die kontinuierliche Phase darstellt, in der das Tensid innerhalb des ternären Systems (Öl/Wasser/Stabilisator) besser löslich ist. Demnach stabilisiert ein besonders lipophiler Emulgator bevorzugt Wasser-in-Öl-Emulsionen, während Emulgatoren mit einem stärker hydrophilen Charakter die Entstehung von Öl-in-Wasser-Emulsionen fördern. Als Orientierungshilfe wird in vielen Fällen auf das Konzept von William C. Griffin zurückgegriffen, das mit Hilfe des HLB-Wertes (engl. Hydrophilic-Lipophilic-Balance) eine quantitative Aussage über das Löslichkeitsverhalten eines gegebenen Emulgators zulässt. Auf einer Skala von 1 (äußerst lipophil) bis 20 (äußerst hydrophil) werden dabei Stabilisatoren mit einem HLB-Wert zwischen 3 und 8 als W/O-Emulgatoren, zwischen 8 und 18 hingegen als O/W-Emulgatoren bezeichnet. Es handelt sich allerdings nur um numerische Werte, das Verhalten des Surfactant *in situ* bleibt in diesem Fall unberücksichtigt. Ebenso wird der Einfluss weiterer Parameter, wie zum Beispiel der Temperatur, außer Acht gelassen.^{72, 81}

2.2.2.1 Stabilisatoren

Die Hauptaufgabe eines Surfactant liegt in der Herabsetzung der Grenzflächenspannung an der Phasengrenze zweier Flüssigkeiten bzw. in der Verringerung der Grenzflächenenergie. Wie bereits in Kapitel 2.2.1.1 angesprochen, adsorbiert er dazu an der Oberfläche der

Tröpfchen und verhindert bzw. verzögert auf diesem Weg ihre Vereinigung. Gleichzeitig übernimmt die ausgebildete Tensidschicht die Funktion einer sterisch und/oder elektrostatisch stabilisierenden Barriere, die einer Annäherung der Tropfen und damit einer Entmischung der Phasen, dem sogenannten Brechen der Emulsion, entgegenwirkt.⁷⁶

Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Schutzschicht spielen die Diffusions- und die Spreitungsgeschwindigkeiten des Emulgators. Die Adsorption verläuft schrittweise, so dass zunächst nur ein Teil der Oberfläche besetzt wird. Durch die Bildung eines Konzentrationsgradienten wird der übrige Ausbau der Schicht fortgesetzt. Er verläuft jedoch in Abhängigkeit von der Spreitungsgeschwindigkeit sowie von der Diffusion der benötigten Stabilisatormoleküle mehr oder weniger schnell und wird neben der Größe der Moleküle auch von der Viskosität der kontinuierlichen Phase beeinflusst. Je kleiner die Moleküle sind und je geringer die Viskosität des Dispersionsmediums ist, umso schneller kann der Emulgator in die Grenzphase gelangen und das Defizit ausgleichen. Es sei aber hinzugefügt, dass eine entsprechend hohe Viskosität der äußeren Phase auch einen stabilisierenden Effekt auf das System ausüben kann, indem sie die Beweglichkeit der Tropfen herabsetzt und damit die Möglichkeit des Zusammenfließens einschränkt.⁸²

Die für gewöhnlich verwendeten Additive lassen sich im Wesentlichen in vier Gruppen unterteilen. Dazu gehören monomere Surfactants, Polymere, kolloide Feststoffpartikel und adsorbierte Ionen. Letztere bilden aufgrund ihrer Ladung eine elektrostatische Barriere zwischen den Tropfen aus und haben darüber hinaus einen Einfluss auf die Orientierung der Lösemittelmoleküle in der Nähe der Grenzfläche. Daraus können sich regional Abweichungen in den physikalischen Eigenschaften ergeben, wie zum Beispiel eine veränderte Dielektrizitätskonstante, Viskosität oder Dichte. Insgesamt tragen sie jedoch nur geringfügig zur Stabilisierung einer Emulsion bei, da sie keine Auswirkung auf die Senkung der Oberflächen- oder Grenzflächenspannung und damit auf die Freie Energie des Systems haben. Ähnlich verhält es sich bei der Adsorption kolloidaler Partikel ($d < 100 \text{ nm}$), die einen Feststofffilm um die Tröpfchen der dispergierten Phase ausbilden. Derart stabilisierte Emulsionen werden nach ihrem Entdecker (Percival S. U. Pickering) Pickering-Emulsionen genannt. Aber auch hier ist der Einfluss auf die Grenzflächenspannung äußerst gering. Die Stabilisierung ergibt sich lediglich aus der Existenz einer Art physikalischen oder auch elektrostatischen Barriere zwischen den Tröpfchen, die eine Annäherung unterbindet. Dabei müssen bestimmte Bedingungen an das verwendete Material geknüpft sein, damit sich ein mechanisch stabiler Feststofffilm entwickeln kann. So sind unter anderem die Größe (sollte im Vergleich zum Emulsionstropfen klein sein), ihre Packungsdichte sowie die Polarität (Oberflächencharakter) der Partikel sehr wichtig. Die Stärke der Hydrophobie/Hydrophilie entscheidet beispielsweise über das Ausmaß der Benetzung der Partikel an der Grenzfläche und infolge dessen über

die Größe des Phasenkontaktwinkels θ , der für die Regulation des Emulsionstypus ausschlaggebend ist. Die Vorteile einer feststoffstabilisierten Emulsion gegenüber anderweitig stabilisierten Systemen ergeben sich vor allem aus einer verbesserten Resistenz gegenüber Änderungen chemischer Parameter (pH-Wert, Salzkonzentration etc.) und der deutlichen Reduzierung eventuell zusätzlich notwendiger Tensidbeigaben. Ferner besteht mittels der Feststoffstabilisierung die Möglichkeit eine entgegengesetzte Phasenlage zu erreichen, als es im Normalfall, unter Verwendung herkömmlicher Stabilisierungsmittel, der Fall wäre. Der stabilisierende Effekt von Polymerzusätzen beruht auf sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen und ihrem Vermögen die Viskosität des Mediums an der Phasengrenze und in der näheren Umgebung der Tröpfchen zu beeinflussen. Verwendet werden sowohl natürliche Polymere, wie z.B. Proteine, als auch synthetische Materialien, wie z.B. Polyacrylsäure oder Polyvinylalkohole. Wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, bieten Polymere aufgrund ihrer besonderen strukturellen Gegebenheit den Vorteil, verstärkt an die Grenzfläche zwischen disperser und kontinuierlicher Phase zu adsorbieren und so eine festere und mechanisch stabilere Schutzschicht auszubilden, als es mit kleineren, monomeren Molekülen möglich wäre. Als nachteilig erweist sich jedoch auch hier der äußerst geringe Beitrag zur Reduktion der Grenz- oder Oberflächenspannung. Eine höhere Effektivität diesbezüglich besitzen hingegen „echte“ Surfactants, d.h. oberflächenaktive Substanzen. Sie bilden im Prinzip die Königsklasse unter den Stabilisatoren, da sie in der Lage sind, die Grenzflächenspannung des Systems merklich zu senken und eine stabilisierende Barriere zwischen den Tropfen zu errichten. Letztere ist aber, infolge der höheren Beweglichkeit der kleinen monomeren Moleküle inner- und außerhalb der Grenzflächenphase, relativ schwach ausgebildet. Daher werden in der Praxis oftmals zwei oder mehr Stabilisierungstechniken miteinander kombiniert, um den Zustand des Systems über einen längeren Zeitraum zu garantieren. Für das optimale Stabilisierungsmittel gibt es jedoch leider kein Patentrezept, es ist von Emulsion zu Emulsion verschieden, so dass bei der Herstellung einer Emulsion häufig mehrere Anläufe erforderlich sind, um ein entsprechend stabiles Produkt zu erhalten. Dabei gilt eine Emulsion im Allgemeinen als stabil, solange sich keine erkennbaren Änderungen in der Tröpfchenzahl, der Größenverteilung und der räumlichen Anordnung der Tröpfchen ergeben.^{72, 76}

2.2.2.2 Destabilisierung

Im ungeschützten Zustand sind Emulsionen äußerst instabil und bleiben meist nur für eine relativ kurze Zeit bestehen, bevor sich die Phasen wieder entmischen. Es ergeben sich unterschiedliche Destabilisierungsmechanismen für das System, die entweder gleichzeitig oder nacheinander ablaufen können und zum Teil schon in Kapitel 2.2.1.1 angesprochen wurden.

Zu den wichtigsten Prozessen gehören Aufrahmen bzw. Sedimentation, Flockung, Koaleszenz und Ostwald-Reifung.

Besteht zwischen der dispersen und kontinuierlichen Phase ein Dichteunterschied, so kann es unter Einfluss des Schwere- oder Zentrifugalfeldes zu vertikal entgegengesetzt gerichteten Bewegungen der Teilchen innerhalb der beiden Phasen kommen. Je nach Dichte (ρ) der dispersen Phase steigen die Tropfen nach oben (Aufrahmen, $\rho_{disp. Phase} < \rho_{konti. Phase}$) oder sinken nach unten (Sedimentation, $\rho_{disp. Phase} > \rho_{konti. Phase}$) (siehe Abbildung 2.11). Die Größenverteilung und die Tröpfchengestalt bleiben erhalten, so dass der Vorgang durch ein leichtes Schütteln oder Rühren der Probe rückgängig gemacht werden kann. Findet zugleich eine Flockung des Systems statt, so kann der Prozess beschleunigt werden, da Flocken schneller sedimentieren oder aufrahmen als einzelne Tröpfchen.^{76, 81, 83, 84}

Eine Flockung wird durch die Anziehungskräfte zwischen den Tropfen hervorgerufen, was ab einem gewissen interpartikulären Abstand zu einer Aggregation der dispergierten Teilchen führen kann. Hierbei begünstigt eine polydisperse Tropfenverteilung den Aggregationsprozess, da die Tröpfchen aufgrund ihrer unterschiedlichen Aufrahm- bzw. Sedimentationsgeschwindigkeiten einen geringeren Abstand zueinander aufweisen, so dass die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenstoßes zunimmt. Während der Annäherung bleibt ein dünner Film des Dispersionsmediums zwischen den Tröpfchen bestehen und trennt sie innerhalb des Verbandes voneinander ab (siehe Abbildung 2.11). Die Stärke der Wechselwirkungskräfte bedingt die Reversibilität des Prozesses und erfordert im Fall hoher Anziehung die Aufbringung größerer Energieeinträge, um die Tropfen zu redispergieren.^{76, 81, 83, 84}

Reißt der schützende Film aus der kontinuierlichen Phase zwischen den Tropfen ab, können die Tropfen miteinander verschmelzen und man spricht von Koaleszenz (siehe Abbildung 2.11). Dabei fließen zwei oder mehr Tropfen zusammen und vereinigen sich unter Bildung eines größeren Tropfens, wodurch die Oberflächenenergie gesenkt wird. Unter diesen Umständen wird die ursprüngliche Größenverteilung der Tröpfchen aufgehoben. Der Prozess ist irreversibel.^{76, 81, 83, 84}

Die Ostwald-Reifung beschreibt im Prinzip den Stofftransport der dispergierten Phase von den kleineren zu den größeren Tröpfchen. Sie wird daher auch als molekulare Diffusion oder isotherme Destillation bezeichnet und ergibt sich aus einem Unterschied im Löslichkeitsverhalten der in den Tropfen eingeschlossenen Moleküle in Abhängigkeit vom Tropfenradius. Aufgrund der stärkeren Krümmung besitzen kleinere Tropfen eine größere spezifische Oberflächenenergie. Der daraus resultierende erhöhte Dampfdruck bewirkt einen Austritt der Moleküle und ihre Wanderung zu den größeren Tropfen. Dies hat einen allgemeinen Anstieg der Tropfengröße zur Folge, wobei die größeren Tropfen auf Kosten der kleineren wachsen

(siehe Abbildung 2.11). Die Geschwindigkeit der Ostwald-Reifung nimmt mit Fortschreiten des Prozessverlaufs ab, da sich die Partikelradien mit der Zeit angleichen und der Konzentrationsunterschied ausgeglichen wird.^{76, 81, 83–85}

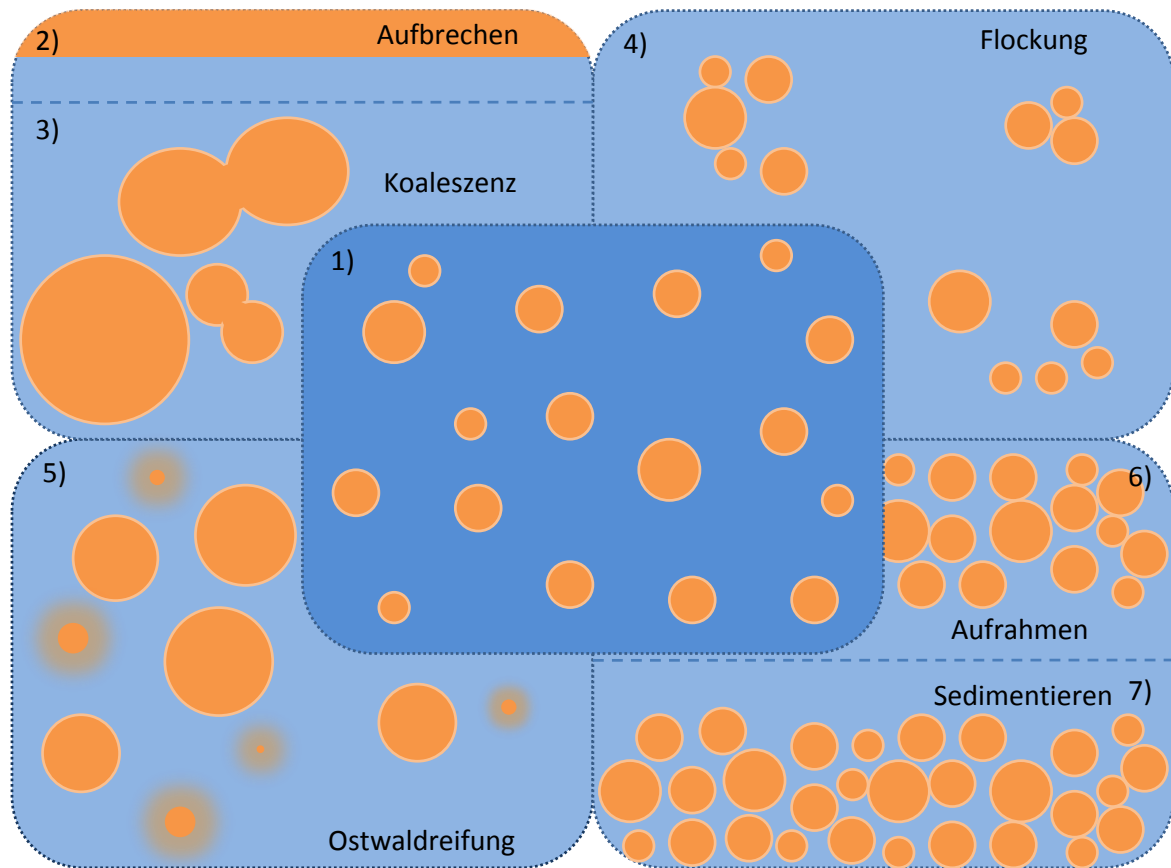


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung potenzieller Destabilisierungsmechanismen von Emulsionen: 1) ursprüngliche Emulsion; 2) vollständiges Aufbrechen der Emulsion in zwei separate Phasen; 3) Destabilisierung durch Koaleszenz; 4) Destabilisierung durch Flockung; 5) Destabilisierung durch Ostwaldreifung; 6/7) Destabilisierung durch Aufrahmen oder Sedimentation (nach [76]).

2.2.2.3 Herstellung kolloidaler Dispersionen/Emulsionen

Um feinteilige Dispersionen mit möglichst kleinen Partikeln bzw. Tropfen sowie einer weitestgehend gleichmäßigen, sprich monodispersen Größenverteilung zu erhalten, ist es aus physikalischer Sicht notwendig, die Grenzfläche zwischen den beteiligten Phasen zu vergrößern. Dies erfordert neben der geschickten Auswahl eines adäquaten Stabilisatorsystems vor allem den Eintrag großer Energiemengen während des Präparationsprozesses, um eine Zerkleinerung des Bulkmaterials mittels so genannter Nass- oder Trockenmahlverfahren herbeizuführen. In der Praxis erfolgt die Umsetzung in der Regel durch den Einsatz von speziellen Rührwerken, Rotor-Statorsystemen, wie z.B. Kolloidmühlen, Ultraschallgeneratoren, Hochdruckhomogenisatoren, Membranen oder ähnlichem, wobei die Teilchen in Abhängigkeit von dem Betrag und der Art der Energiezufuhr auf mechanischen Weg durch ein „Zer-

reißen“ der Phasen gebildet werden.^{72, 81, 86, 87} Wirtschaftlich betrachtet wird sich diese Methode jedoch angesichts des damit verbundenen hohen energetischen und finanziellen Aufwands sowie den stetig wachsenden technologischen Ansprüchen zukünftig vermutlich nicht länger durchsetzen können. Dabei erweist sich insbesondere die Unzulänglichkeit dieser recht groben Zerkleinerungstechnik, Produktionserfolge mit Partikeldimensionen im unteren Mikro- und Nanometerbereich zu verzeichnen und zugleich einen Materialabrieb des Werkzeugs oder Homogenitätsverluste in der Probe auszuschließen, als problematisch.⁸⁸

Eine alternative Synthesestrategie stellt die Methode des bottom-up Verfahrens dar. Hierbei gelingt die Präparation nanoskaliger Dispersionen bzw. Emulsionen durch Fällungs- oder Kondensationsreaktionen eines dispersen, homogen durchmischten Systems aus einer Lösung.⁸⁸ Unter den verschiedenen möglichen methodischen Ansätzen hat sich im Speziellen ein Verfahren etabliert, das, nicht zuletzt aufgrund seines sicherlich exotisch klingenden Namens, verstärkt Aufmerksamkeit auf sich zieht und auch im Rahmen dieses Arbeitsprojektes die Methode der Wahl ist.

Der Ouzo-Effekt

Entgegen der vielleicht landläufigen, weit verbreiteten Meinung beschreibt der Ouzo-Effekt nicht etwa den körperlich mehr oder weniger dispersen Zustand, den manch einer einnimmt, wenn er mal wieder „zu tief ins Glas geschaut“ hat. Vielmehr leitet sich der Begriff von der zu beobachtenden milchig weißen Trübung ab, die auftritt, wenn klare anisöhlaltige Spirituosen, wie z.B. Ouzo, Raki, Pastis oder dergleichen mit Wasser verdünnt oder sehr stark gekühlt werden – kommerziell auch unter dem Namen Löwenmilch erhältlich.⁹ Dabei ruft die Zugabe des Wassers zu der üblicherweise transparenten, alkoholischen Lösung (Ethanolgehalt ~ 40 Vol.-%) eine Emulgierung des Systems hervor. Infolge der Verdünnung wird die Löslichkeit des Anisöls (hauptsächlich *trans*-Anethol) überschritten und es fällt in Form kleinster Emulsionstropfen aus. Die feinen Tröpfchen streuen das sichtbare Licht, so dass das Getränk weißlich erscheint.⁹⁰

Die Bezeichnungen „Ouzo-Effekt“ oder auch „Ouzo-Prozess“ entspringen der Kreativität zweier zeitgenössischer Wissenschaftler, Steven A. Vitale und Joseph L. Katz, die damit 2003 in recht anschaulicher Weise das schon länger bekannte physikalische Phänomen der „spontanen Emulgierung“ erläuterten.⁹⁰ Weitere experimentelle und theoretische Studien zu diesem Themengebiet finden sich auch unter eng verwandten oder synonymen Fachtermini wie zum Beispiel „Solvent shifting“, „Diffusion and Stranding“ oder „Binodale Entmischung“

⁹ „Am Abend sollten Sie unbedingt Löwenmilch probieren. Dieses Getränk heißt Löwenmilch, weil jeder, der davon 1–2 Gläser trinkt, sich wie ein Löwe fühlt.“ (Empfehlung der Speisekarte eines ägäischen Grillrestaurants in Berlin).⁸⁹

und lassen sich bis zu (ersten) Untersuchungen in den 50er und 60er Jahren des vorherigen Jahrhunderts zurückverfolgen.^{88, 91–96} Trotz dieser langen Zeitspanne ist man aber von einer vollständigen Aufklärung des Phänomens noch weit entfernt. Nach der Ansicht von S. A. Vitale und J. L. Katz entstehen die Tropfen mittels homogener Flüssig-Flüssig-Keimbildung. Die Grundlage bildet im einfachsten Fall ein ternäres System, bestehend aus einer binären Lösung eines hydrophoben Stoffes (allg. ein Öl) in einem hydrophilen/polaren Lösemittel (meist kurzkettiger Alkohol) und eine wässrige Phase. Die Auswahl der dritten Komponente ist nicht ausschließlich auf das Medium Wasser beschränkt. Eine wesentliche Rolle für den Erfolg der spontanen Emulsionsbildung spielen zum Einen die gegebenen Löslichkeitseigenschaften der verwendeten Komponenten. So sollte sich die hydrophobe Substanz nicht oder nur sehr schlecht in der dritten Komponente, der kontinuierlichen Phase, lösen. Das Lösemittel sollte hingegen vollständig mit der kontinuierlichen Phase mischbar sein. Zum Anderen ist das Verhältnis zwischen den einzelnen Komponenten zueinander entscheidend für die Bildung, die Beschaffenheit und den Typus der Emulsion. Um eine relativ stabile und möglichst feindisperse Emulsion zu erhalten, ist es wichtig, eine recht gering konzentrierte organische Lösung mit einem entsprechend niedrigen Öl-zu-Lösemittel-Verhältnis zu verwenden. Gleichzeitig benötigt man einen hohen Überschuss an wässriger Phase. Die Vereinigung der beiden Phasen miteinander wird in der Literatur auf diverse Weise ausgeführt und hinsichtlich unterschiedlicher, oft gegenläufiger Aspekte diskutiert. Nach dem Präparationsansatz von S. A. Vitale und J. L. Katz erfolgt die Fusion über eine zügige Überführung der wässrigen in die organische Phase, ohne dass eine Durchmischung der entstehenden Dispersion mittels externer Rührgeräte erforderlich ist. Laut der Meinung der Autoren schädige eine Rührbewegung die Emulsion und könnte aufgrund der Scherung ein Aufplatzen größerer Tropfen bewirken.⁹⁰ Kawthar Bouchemal et al. verfolgen hingegen den umgekehrten Ablauf der Vermischung und unterstützen den Emulgierungsprozess durch leichtes Rühren der Probe.⁹¹ Ebenso strittig handhabt man die Zuhilfenahme von Dispergiermitteln – der exemplarische Verzicht auf Surfactant scheint einem positiven Resultat zumindest nicht im Wege zu stehen.⁹⁰ Verbreitete Untersuchungsobjekte stellen neben dem Vorzeigemodell *trans*-Anethol/Ethanol/Wasser beispielsweise die Systeme Divinylbenzol(DVB)/Ethanol/Wasser, Miglyol/Aceton/Wasser, Toluol/Wasser/Ethanol oder auch PMMA/Toluol/Wasser dar.^{90–92, 94}
^{96, 97} Anhand von Untersuchungen am Testmodell DVB/Ethanol/Wasser sind nach S. A. Vitale et al. folgende Erkenntnisse gewonnen worden:

- Die durchschnittliche Teilchen- bzw. Tropfengröße ist bei gegebener Temperatur lediglich eine Funktion des Öl-zu-Lösemittelverhältnisses,
- die Breite der Größenverteilung kann durch Temperaturerhöhung während des Mischvorgangs und anschließendem Abkühlen der Dispersion/Emulsion auf Raumtemperatur geschmälert werden,

- die Größenstatistik folgt einer logarithmischen Normalverteilung,
- die Teilchen- bzw. Tropfendichte kann in Abhängigkeit vom Volumen der hinzugefügten dritten Komponente kontrolliert werden. Sie ist von der Teilchengröße unabhängig.

Die einzelnen Schritte des Ouzo-Effekts werden nach heutigem Wissensstand über den Mechanismus der homogenen Keimbildung und nachfolgendem Wachstum der Tropfen beschrieben (siehe Abbildung 2.12).

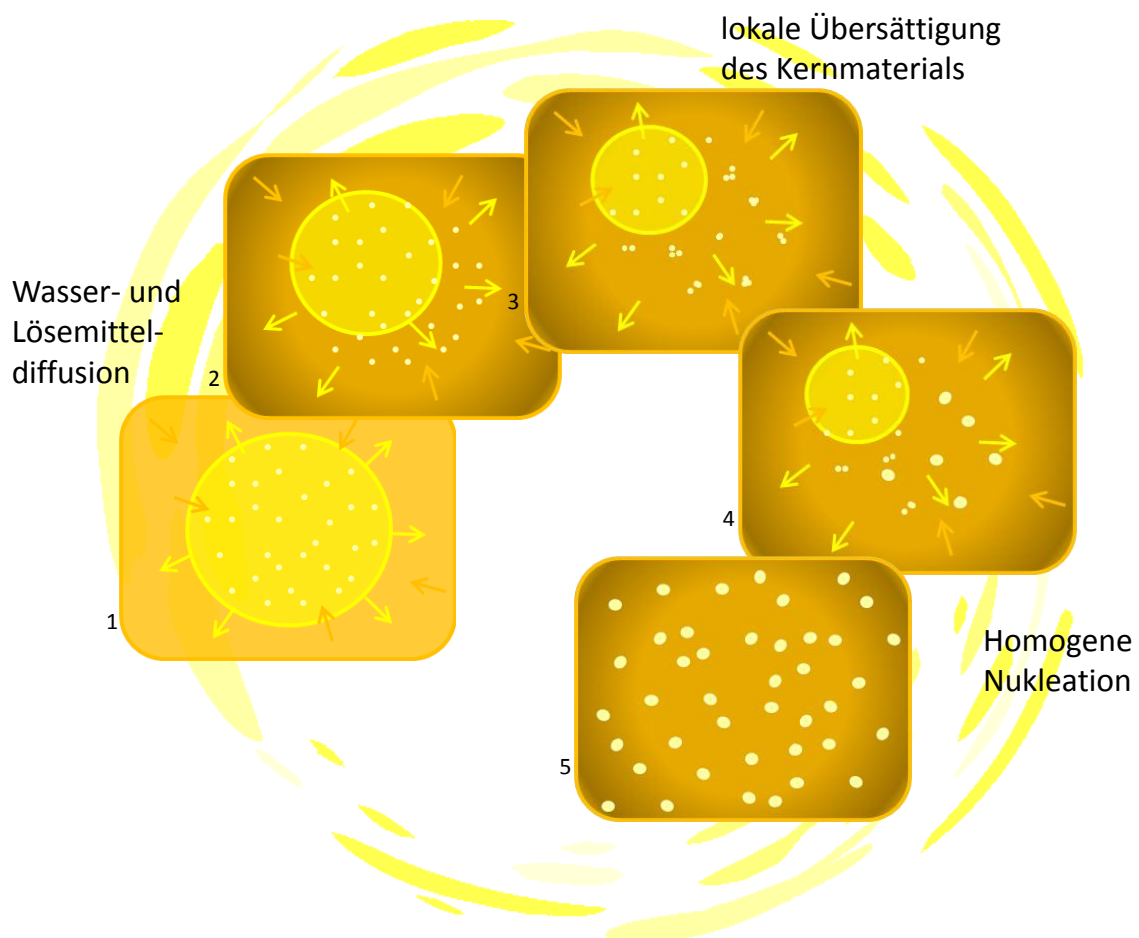


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der einzelnen Stufen des Ouzo-Effekts bzw. der spontanen Emulgierung (Schritte 1–5). Der Alkohol (gelb) enthält die hydrophoben Ölmoleküle (weiß) und ist von der wässrigen Phase (orange) umgeben. Die Diffusion von Alkohol- und Wassermolekülen verursacht die Übersättigung von Öl in der wässrigen Phase und die anschließende Keimbildung.

Dabei kommt es während der Vermischung der beiden Phasen (Öl in Alkohol und Wasser) zu einer Übersättigung der Ölkonzentration. Der Alkohol diffundiert infolge seiner Hydrophilie in die wässrige Phase und umgekehrt (1). Durch die stetige Verdünnung der alkoholischen Lösung bleibt das hydrophobe Öl zurück, so dass die wässrige Phase hinsichtlich des Öls übersättigt (2). Ist die Übersättigung hoch genug, beginnt die Nukleation. Hierbei führen schon geringe lokale Fluktuationen in der Ölkonzentration zu einer spontanen Entwicklung

der Keime (3–5).^{90, 98} In Anlehnung an das Konzept der klassischen Keimbildungstheorie lagern sich dafür die einzelnen Ölmoleküle zu einem größeren Verband, dem Keim oder Nukleus (veraltet: Embryo) zusammen, was den Abbau von Öl in der Nähe jedes Keims zur Folge hat.⁹⁹ Die Startgeschwindigkeit der Keimbildung ist relativ hoch (*ms* oder schneller), so dass zunächst sehr viele Keime entstehen. Existieren keine Bereiche mit ausreichend hoher Übersättigung mehr, bricht der Vorgang ab. Haben die Keime eine kritische Größe überschritten, setzt sich ihr Wachstum zu größeren Tropfen fort. Erreichen sie diese Größe nicht, lösen sie sich wieder auf. Das Stadium des Tropfenwachstums beruht nach Aussage von Vitale et al. fast ausschließlich auf dem diffusionsgetriebenen Prozess der Ostwaldreifung, begründet in der Notwendigkeit sehr niedriger Auflösungsgeschwindigkeiten und langsamen Diffusionszeiten (*s* oder langsamer), sobald sich die Teilchendichte verringert und sich die Tropfen voneinander entfernen. In guter Übereinstimmung damit bekräftigen die Ergebnisse dynamischer Lichtstreuungsexperimente der Arbeitsgruppe um Natalia L. Sitnikova diese Schlussfolgerung. Als Konsequenz der Ostwaldreifung belegen ihre Studien am System *trans*-Anethol/Ethanol/Wasser einen linearen Zusammenhang zwischen der Änderung des Tropfenvolumens und dem Beobachtungszeitraum. Eine exponentielle Beziehung, wie sie für das Auftreten einer Koaleszenz zu erwarten wäre, ist hier zu keinem Zeitpunkt festgestellt worden und wird infolge dessen ausgeschlossen.⁹² Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Versuche von David Carteau et al., die den Austausch zwischen „freiem“ und „eingebundenem“ Öl jener Startsituation im gleichen System mittels Kernresonanzspektroskopie untersucht haben. Gemäß ihren Beobachtungen kommt es nach dem Nukleationsschritt zur Bildung kleinerer Aggregate in der Größenordnung von 2 bis 6 *nm*, welche dann erst, über schnelle Koaleszenz, den Übergang zur Tröpfchenstruktur durchlaufen. Die Koaleszenz setzt sich fort, bis die Konzentration der kleinen Aggregate so weit gesunken ist, dass der Vorgang ineffizient wird. Erst dann tritt eine Vergrößerung der Tropfen per Ostwaldreifung ein und zerstört die noch übriggebliebenen Aggregate zu Gunsten der Bildung größerer Tropfen mit endgültigen Durchmessern von wenigen Mikrometern.⁹⁴ Diese Hypothese wird auch in früheren Arbeiten durch Vladimir Privman et al. vertreten, die in den späten 90er Jahren ein kinetisches Modell für die Partikelentstehung in kolloidalen Systemen auf Basis von sogenannten Precursorstrukturen bzw. Primärpartikeln (Singletts) entwickelten.¹⁰⁰

Im Rahmen der „klassischen“ Keimbildungstheorie von S. A. Vitale und J. L. Katz befindet sich ein übersättigtes System im metastabilen Bereich des entsprechenden Phasendiagramms, zwischen der binodalen und der spinodalen Kurve (siehe Abbildung 2.13, links). Diese sogenannte „Ouzo-Region“ lässt sich in eine stabile und eine instabile Phase unterteilen. Letztere lokalisiert sich in der Nähe der spinodalen Grenze und kennzeichnet damit den Bereich der spinodalen Zersetzung oder auch Entmischung. Außerhalb der Binodalen ist die Lösungszusammensetzung einphasig. Wird diese Lösung durch Änderungen in der Zu-

sammensetzung oder auch durch Temperaturänderungen schnell genug in den metastabilen Bereich überführt, erfolgt mittels des Ouzo-Effekts eine Phasentrennung des Systems.¹⁰¹ Diese verläuft innerhalb der stabilen Ouzo-Region über den Prozess der Keimbildung und anschließendem Tropfenwachstum, wie bereits beschrieben. In Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen kann das System aber auch Zustände im weniger stabilen Ouzo-Bereich einnehmen. In diesem Fall existieren neben der eigentlichen Ouzophase weitere, makroskopisch große Tropfen bzw. Partikel, die infolge von Koaleszenz sehr schnell wachsen und letztlich für eine vollständige Separation des Systems in seine Bulkphasen sorgen.^{90, 96}

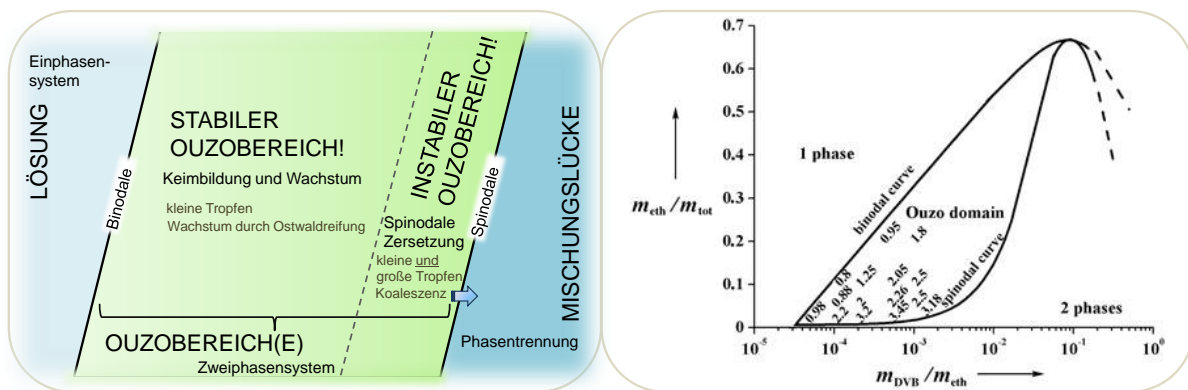


Abbildung 2.13: Links: Modellhafte Darstellung 3-Komponenten-Phasendiagramms. Um den Ouzo-Effekt auszunutzen, muss das System vom einphasigen Bereich in den stabilen Ouzobereich zwischen den binodalen und spinodalen Kurven gelangen. Rechts: Phasendiagramm als Beispiel für das System DVB/Ethanol/Wasser (aus [93]). Aufgetragen sind der Massenanteil von DVB in Ethanol gegen den Massenanteil von Ethanol im endgültigen Ethanol/Wasser-Gemisch. Die ermittelten, durchschnittlichen Tröpfchengrößen [μm] wurden innerhalb des Ouzobereichs für verschiedene Ethanol/Wasser/DVB-Konzentrationen eingetragen.

Am Beispiel des Phasendiagramms für das System DVB/Ethanol/Wasser (siehe Abbildung 2.13, rechts) lässt sich erkennen, dass die Tropfen umso größer werden, je weiter sich der Ouzobereich der spinodalen Kurve annähert. Gleichzeitig wächst der Tropfendurchmesser, bei gegebener Ethanolkonzentration, mit zunehmendem Ölgehalt. Daraus schlussfolgern Vitale et al., dass bei einem kleinen Öl-zu-Lösemittel-Verhältnis überwiegend kleinere Teilchen gebildet werden, weil sich nur relativ wenige Ölmoleküle in der Nähe jedes Keims befinden. Andersherum entstehen verstärkt größere Tropfen, wenn das Verhältnis von Öl zu Lösemittel hoch ist, da auf diese Weise mehr Ölmoleküle in der unmittelbaren Umgebung eines Keims anzutreffen sind. Ist die Ölkonzentration und damit die Übersättigung zu hoch, gelangt das System in den Bereich der spinodalen Zersetzung und die Emulsion bricht.^h

Die Verteilungsbreite der Tröpfchengröße ist, wie zuvor erwähnt, eine Funktion der Temperatur des Präparationsprozesses. Wird das System erwärmt, trägt die Temperaturzunahme zu einer erhöhten Löslichkeit des Öls in der hydroalkoholischen Phase bei, was bedeutet, dass

^h Bei dem hiesigen System trennt sich der stabile vom instabilen Ouzo-Bereich laut Literaturangaben bei einem Öl-zu-Lösemittel-Verhältnis von ungefähr 1 zu 20.

weniger Öl für die Keimbildung zur Verfügung steht. Wird das System anschließend auf Raumtemperatur heruntergekühlt, nimmt die Löslichkeit des Öls wieder ab. Da es sich beim Kühlen jedoch um einen relativ langsamen Vorgang handelt, steigt die Konzentration des Öls nicht schnell genug an, um eine erneute Übersättigung und Nukleation zu verursachen. Stattdessen diffundieren die Ölmoleküle zu bereits existierenden Tropfen und bewirken bei annähernd identischem Adsorptionsvolumen eine stärkere Zunahme des Tropfendurchmessers kleiner gegenüber größerer Teilchen. Zudem sorgt der Prozess der Ostwaldreifung für die Verringerung der Anzahl kleiner Tropfen, was insgesamt zu einer Schmälerung der Größenverteilung führt.

Die Teilchendichte wird von der zugegebenen Menge Wasser beeinflusst, wobei das System ab einem bestimmten Volumen soweit verdünnt ist, dass die Teilchendichte mit zunehmenden Lösungsvolumen abnimmt. Einen wichtigen Faktor für die Stabilität von Ouzo-Emulsionen bzw. Emulsionen generell stellt – neben der Tropfengröße und dem Grad der Monodispersität – der Dichteunterschied zwischen der dispersen und der kontinuierlichen Phase dar. Je geringer dieser ausfällt und je kleiner und einheitlicher die Tröpfchengrößen sind, umso stabiler ist das System. Die experimentell ermittelten Tropfengrößen liegen bei Vitale et al. zwischen 1 und 4 μm und bleiben über einen Zeitraum von einigen Monaten stabil. Hierbei sind die Teilchen einerseits groß genug, um ein Fortschreiten der Ostwaldreifung weitestgehend zu unterdrücken und andererseits klein genug, um ein frühzeitiges Aufräumen zu unterbinden. Unter Zuhilfenahme grenzflächenaktiver Substanzen wie Dextran oder Block-Copolymeren lässt sich der disperse Zustand sogar über sechs Monate hinaus aufrechterhalten.⁹³ Als ebenso stabil erweist sich auch das System *trans*-Anethol/Ethanol/Wasser mit einer durchschnittlichen Tropfengröße von ungefähr 1,5 μm und einer Stabilitätsdauer von bis zu drei Monaten ohne den Zusatz von Surfactant und ohne Rühren.⁹² Eine weitere Möglichkeit, die Stabilität einer Dispersion oder Emulsion zu erhöhen, stellt der Einschluss der Tröpfchen innerhalb einer festen Polymerhülle dar; in diesem Fall spricht man von Mikro- oder auch Nanokapseln. Die Polymermembran bietet den Vorteil den

Inhalt vor einer Destabilisierung durch Koaleszenz und Ostwaldreifung zu schützen. Eine ausführlichere Beschreibung dieser Thematik findet sich im Anschluss an dieses Kapitel.

Abschließend ist für diesen Abschnitt festzuhalten, dass sich mittels der Ouzo-Methode bzw. durch den Prozess der spontanen Emulgierung auf relativ einfache Weise metastabile, homogene und feindisperse Emulsionen herstellen lassen. Dazu sind weder ein hoher (labor)technischer Aufwand noch hohe energetische Kosten aufzubringen. Nebenbei kann die Surfactant- oder Emulgatorkonzentration auf ein Minimum reduziert und auch der Umgang mit gesundheits- und umweltschädlichen Lösemitteln deutlich eingeschränkt werden.

2.2.3 Nanopartikel

Wird die (Vor)silbe „nano“ in den Raum geworfen, dauert es nicht sehr lang, bis aus ihr der Anfang einer scheinbar nicht enden wollenden Assoziationskette vielversprechender und werbeträchtiger Trendbegriffe geworden ist, die es einem in der modernen Zeit unmöglich machen, nicht ein Opfer ihrer Konfrontation und Vermarktung geworden zu sein, auch wenn dem Ottonormalverbraucher die genaue Bedeutung des Wortes in der Regel verschlossen bleibt. Nano ist „in“! Nano heißt Innovation, nano repräsentiert Zukunft und Fortschritt, nano ist Hightech! Es gibt Nanoreinigungsmittel, das Automobil Tata Nano™, Nano-Food und den Digital Audio Player iPod nano™. Der Begriff „Nano“ ist mittlerweile so umfassend, dass damit sogar eigens dafür eingerichtete Studiengänge beworben werden.¹⁰² Die Nanotechnologie wird zu den wichtigsten Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts gezählt. Dabei ist sie längst nicht so neu, wie man vielleicht glauben mag, denn ihre Grundlage bildet die Kolloidwissenschaft und diese ist, wie das vorherige Kapitel zeigt, kein Novum mehr. Die Vorsilbe „nano“ stammt von dem griechischen Wort *nanos* ab und bedeutet übersetzt so viel wie „Zwerg“. Durch sie wird der Größenbereich von einem tausendstel bis hinunter zu einem millionstel Millimeter abgesteckt. Aufgrund der geringen Größe weisen Strukturen dieser Dimension im Vergleich zur makroskopischen Welt ein verändertes chemisches, magnetisches, optisches sowie elektrisches Verhalten auf und wecken damit das Interesse diverser naturwissenschaftlicher Fachrichtungen.^{88, 103}

Hinsichtlich der genannten Zielsetzungen und Ansprüche an „moderne“ medizinische Arzneimittel im Allgemeinen und der Entwicklung von Sauerstofftherapeutika im Speziellen stellen kolloidale Wirkstoffträger bzw. Wirkstoffsysteme im Nanometermaßstab einen der Mittelpunkte der aktuellen Forschung dar. Dabei birgt der nanodisperse Zustand infolge der Modifizierung entscheidender, nanospezifischer Eigenschaften den Vorteil eines gesteigerten Löslichkeitsverhaltens und eine verbesserte biologische Resorption des medikamentösen Therapiemittels. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts sprach der deutsche Chemiker und Arzt Paul Ehrlich von sogenannten Magic Bullets (Zauberkugeln) als Transportmittel für eine gezielte und effiziente Anwendung von Medikamenten.^{104, 105} Zu den traditionellen Forschungsobjekten der letzten 60 Jahre gehören O/W-Emulsionen, Liposomen und feste Lipidpartikel sowie Mikro- und Nanopartikel aus synthetischen Polymeren und natürlichen Makromolekülen. Der Einstieg gelang in den 50er Jahren mit der Verwendung von Öl-in-Wasser-Emulsionen als Mittel für die parenterale Ernährung. Der Einsatz in Funktion eines wirkstoffenthaltenden Delivery-Systems erfolgte später in Form von Diazemuls® mit Diazepam als Psychopharmakon oder Etomidat®-Lipuro mit dem Hypnotikum Etomidat. Die Breite der emulsionsbasierten Produktpalette erweist sich jedoch als relativ schmal, zurück-

zuföhren auf ihre geringe physikalische Stabilität und die begrenzte Löslichkeit vieler Wirkstoffe in den bisher wenigen zugelassenen Ölen wie beispielsweise Sojabohnenöl.¹⁰⁶

Als bereits intensiv erforscht gelten Liposomen. Hierbei handelt es sich um kugelförmige Gebilde aus Phospholipid-Doppelschichten. Das Interesse an solchen Phospholipidvesikeln wurde 1964 durch den britischen Hämatologen Alec D. Bangham geweckt, der sie, vermutlich scherzhaft, als Banghasomen bezeichnete.¹⁰⁷ Die Grundbausteine bilden amphiphile Phospholipidmoleküle, die sich in wässriger Lösung spontan zu Liposomen zusammenlagern. Man unterscheidet zwischen unilamellaren (\varnothing : 20 bis 50 nm) und multilamellaren (\varnothing : bis zu 10 μ m) Liposomen. Aufgrund ihrer bipolaren Eigenschaften können sie sowohl wasser- als auch fettlösliche Wirkstoffe aufnehmen, wobei mehrere Möglichkeiten bestehen, den Wirkstoff zu transportieren.^{108, 109}

Der Wirkstoffbeladungsgrad und die Wirkstoff-Freigabe sind von der Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl sowie der Größe der Liposomen abhängig. Wegen ihrer hohen Bioakzeptanz und der guten Bioabbaubarkeit galten sie bezüglich der Wirkstoffapplikation, im Besonderen für den Einsatz von Tumortheraeutika, zunächst als vielversprechend. So konnten zum Beispiel Mitte der 90er Jahre mit Doxil[®], DaunoXome[®] und Myocet[®] die ersten liposomalen Tumortheraeutika auf den Markt gebracht werden. Weiterhin finden sie erfolgreich Verwendung in der Kosmetikindustrie in Form von Hautschutz- und Heilsalben. 1986 sorgte die Firma Dior mit dem Anti-Aging-Mittel Capture als erstes liposomales Produkt für Aufsehen. Als nachteilig erweisen sich jedoch die geringe Lagerstabilität und eine im großtechnischen Maßstab komplizierte und kostenintensive Produktion, so dass die Anzahl liposomaler Arzneimittel gering ist.^{12, 106, 108, 109}

Angesichts der ausgezeichneten biologischen Verträglichkeit von Phospholipiden richtet sich die Aufmerksamkeit seit dem Beginn der 1990 Jahre auf die Entwicklung fester nanoskaliger Lipidpartikel (SLN: Solid Lipid Nanoparticle) als Matrixmaterial für Wirkstoffträgersysteme. Bei physiologischen Temperaturen bilden sich feste Strukturen aus, die mittels eines Surfactants stabilisiert werden können, wobei sich eine mehrjährige Haltbarkeit ergibt. Als äußerst positiv stellt sich zudem die großtechnisch kostengünstige und einfache Produktionsweise heraus. Das große Problem besteht jedoch in einer zu niedrigen Wirkstoffbeladung aufgrund der geringen Wirkstofflöslichkeit der Lipide. Einen Ausweg stellen Lipid-Wirkstoffkonjugate dar. Ihr Potenzial wird seit einiger Zeit getestet.^{87, 106}

2.2.3.1 Polymer-Nanopartikel: Nanosphären und Nanokapseln

Auf der Suche nach neuen kolloidalen Wirkstoffträgern wurden Anfang der 1970er Jahre auch Polymer-Nanopartikel als Alternative zu den liposomalen Drug-Delivery-Systemen erforscht.¹¹⁰ Zur Synthese können dabei verschiedene natürliche oder bioverträgliche synthetische Polymere, wie z.B. Polysaccharide, Polymilchsäure, Polyacrylate oder Polyalkylcyanacrylate, genutzt werden. Ende der 90er Jahre gelang es dem Arbeitskreis um Jörg Kreuter mittels Polymer-Nanopartikeln aus Polybutylcyanacrylaten das Krebstherapeutikum Doxorubicin über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn von Ratten zu transportieren.¹¹¹ Weiterhin konnte ein Delivery-System aus PLGA-Nanopartikeln für den Transport entzündungshemmender Arzneimittel (Rolipram) bei Darmentzündungen entwickelt werden. Der Vorteil der Polymer-Nanopartikel gegenüber anderen Applikationsmitteln besteht in ihrer Einlagerung in die Darmschleimhaut und der Bildung eines Wirkstoffdepots.¹¹² Laufende Forschungsthemen beziehen sich mitunter auf die Oberflächenoptimierung zur erhöhten Verweildauer der Partikel in der Blutbahn und damit zu einer gezielten Anreicherung am vorgesehenen Wirkort. Darüber hinaus sind Entwicklungen zum Einschluss hydrophiler Verbindungen, wie beispielsweise Proteine oder Peptide, angedacht.¹¹³ Weitere Untersuchungsinhalte betreffen die Verwendung von Polymer-Nanopartikeln in der Tumor- und AIDS-Therapie, für die Applikation von Antibiotika, sowie als Vehikel zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke.¹⁰⁵

Nach Patrick Couvreur und Jörg Kreuter lassen sich Nanopartikel in zwei morphologisch verschiedene Partikeltypen unterteilen. Man differenziert in Nanosphären und Nanokapseln. Nanosphären sind kugelförmige Kolloidteilchen, bestehend aus einer durchgehenden Polymermatrix, über die das Therapeutikum verteilt vorliegt. Die genaue Art der Wirkstofflagerung ist noch ungeklärt, spaltet sich jedoch in die Annahmen, dass das Arzneimittel in das Polymergerüst eingeschlossen, an der Partikeloberfläche adsorbiert oder mittels beider Mechanismen aufgenommen wird. Dagegen handelt es sich bei Nanokapseln um eine Polymerschicht, die einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum umschließt, in dem der Wirkstoff gelöst vorliegen kann (siehe Abbildung 2.14).^{87, 113–115}

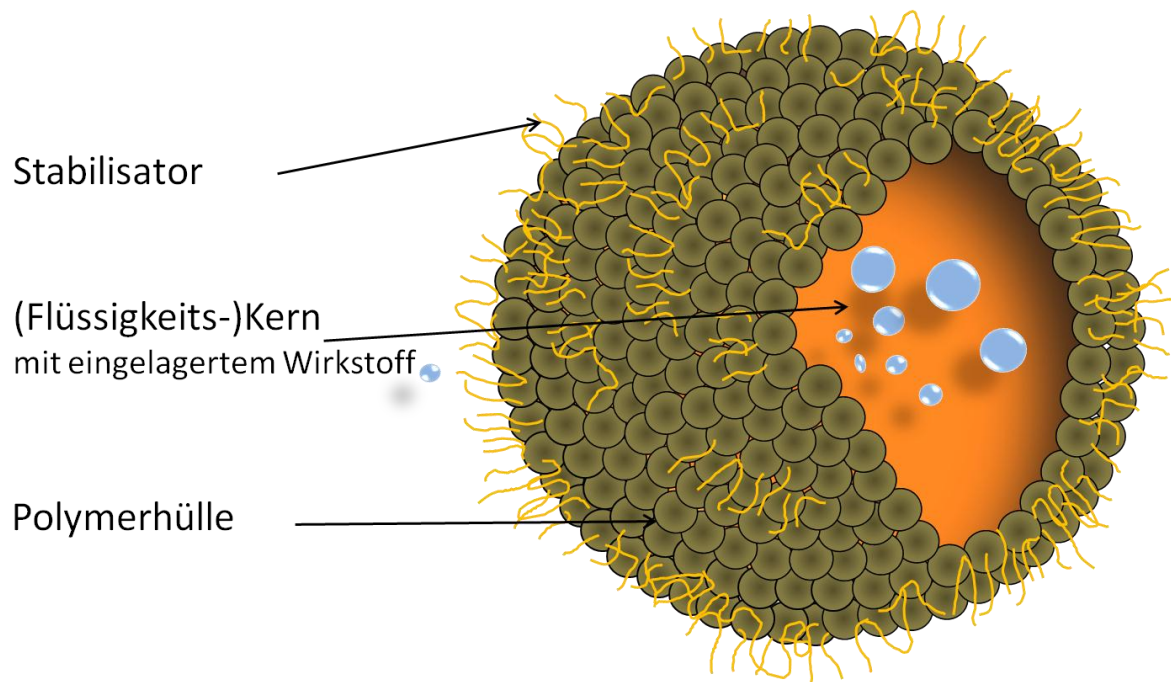


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung einer Polymer-Nanokapsel. Im Inneren befindet sich der Kapselkern (orange), im Allgemeinen bestehend aus einem Öl, in dem beispielsweise ein pharmazeutischer Wirkstoff (blau) eingelagert sein kann. Der Kern wird von einer Polymerschale (braun) umschlossen. Zur Stabilisierung des dispersen Zustandes können auf der Polymeroberfläche Stabilisatormoleküle (gelb), z. B. Blockcopolymere, aufgebracht werden.

Die Vorteile gegenüber anderen kolloiden Drug-Delivery-Systemen wie Liposomen oder Emulsionen liegen in der vergleichsweise festen partikulären Struktur und der daraus resultierenden hohen kinetischen Stabilität.⁸⁷ Hierdurch lässt sich die therapeutische Effizienz deutlich heraufsetzen, abzuleiten aus der Möglichkeit eines kontrollierten Wirkstoffdistributionsmusters und einer Verminderung der einzusetzenden Wirkstoffkonzentration, so dass die Risiken begleitender Erkrankungserscheinungen und toxischer Effekte gesenkt werden können – ein perfekt abgestimmtes Zusammenspiel von Trägermaterial, Wirkstoff und weiterer Hilfs- oder Zusatzsubstanzen sowie die Biokompatibilität des Gesamtpakets natürlich vorausgesetzt.^{113, 116, 117}

Aufgrund der voneinander abweichenden Morphologien ergibt sich ein unterschiedliches Wirkstofffreisetzungsprofil. Während die Freisetzung bei den Nanosphären mit der Zeit exponentiell abfällt, bleibt sie bei den Nanokapseln über einen längeren Zeitraum konstant. Im Vergleich mit Nanosphären begünstigen die relativ dünne Polymerhülle und die vollständige Maskierung des Einschlussprodukts die Verwendung von Nanokapseln als Drug-Delivery-Systeme. Ihre Architektur sichert eine höhere Aufnahmekapazität und aufgrund des vollständigen Einschlusses einen besseren Schutz vor einer frühzeitigen Zersetzung durch die körpereigene Abwehr. Dies hat jedoch zur Folge, dass die Freisetzung und die Verteilung des Wirkstoffs von den Eigenschaften der Kapselwand abhängig sind.^{114, 115, 118}

Die ersten Nanosphären wurden 1976 von den beiden Wissenschaftlern Gerd Birrenbach und Peter Speiser aus Polyacrylat synthetisiert.¹¹⁹ Nahezu zeitgleich folgten Darstellungen mittels Polyacrylamid und Polyalkylmethacrylaten als polymere Trägermaterialien.¹²⁰ Die Produkte waren jedoch aufgrund ihrer schlechten Bioabbaubarkeit nicht für den Transport von Arzneimitteln geeignet.

Biologisch abbaubare Nanosphären konnten 1979 von Patrick Couvreur mittels anionischer Polymerisation von Acrylcyanacrylaten hergestellt werden.¹²¹ Dazu wird das Monomer unter Rühren in eine wässrige Tensidlösung getropft, wobei sich wasserunlösliche Monomertropfchen bilden. Unter der Annahme, dass diese in parallel vorliegende Tensidmizellen diffundieren, wird die Polymerisation durch OH⁻-Ionen aus der Autoprotolyse des Wassers initiiert.^{121, 122} Über die Synthese erster Nanokapseln auf Basis von Poly(isobutyl-2-cyanoacrylat) berichtete 1986 die Arbeitsgruppe um Nazir Al Khouri Fallouh.¹¹ Die Darstellung erfolgt mittels einer Grenzflächenpolymerisation. Das Monomer wird in einer Öl-enthaltenden Ethanolphase gelöst und diese organische Phase in einer wässrigen Tensidlösung dispergiert, wobei sich eine Öl-in-Wasser-Emulsion bildet. An der Grenzfläche beider Phasen reagiert das amphiphile Monomer in einer anionischen Polymerisation und bildet die Nanokapseln. Wird zuvor eine lipophile Verbindung in der Ölphase gelöst, kann diese zusammen mit dem Öl eingekapselt werden.¹²³ So konnte, wie in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben, 1994 Hämoglobin durch W. Yu und T. Chang eingekapselt werden.¹²⁴

2.2.3.2 Herstellung polymerer Nanopartikel

Prinzipiell ergeben sich verschiedene Techniken für die Präparation polymerer Nanopartikel. Grundlegend lassen sich jedoch zwei methodische Vorgehensweisen voneinander unterscheiden – chemische Polymerisationsprozesse und physikochemische Verfahren über Dispersionen synthetischer oder natürlicher vorab gebildeter Polymere und Makromoleküle.^{116, 118} Dabei muss die Koordination der Syntheseroute und des entsprechenden Synthesematerials auf die spätere Applikationsform des Medikaments bzw. des Drug-Delivery-Systems (peroral, intravenös, parenteral, subkutan etc.) ausgerichtet sein und verlangt die Berücksichtigung einer Vielzahl pharmakologischer Parameter. Oftmals erweist sich jedoch der zu meist stark lipophile Charakter vieler organischer Wirkstoffe als problematisch und bedingt die Ausführung spezieller Formulierungstechniken.⁸⁸ Trotzdem sollte bei der Präparation nach Möglichkeit auf toxische oder gesundheitlich bedenkliche Synthesemedien, Lösemittel und Materialien verzichtet werden. Hier stellen wohl wässrige Formulierungen bioverträglicher und bioabbaubarer nanopartikulärer polymerer Träger, nicht nur in Hinblick auf die Entwicklung blutadaptiver Therapiemittel, die ultimative Darreichungsform dar. In der Realität kann der Einsatz organischer Lösemittel aber nicht immer umgangen werden, so dass nach-

trägliche Reinigungsschritte unternommen werden müssen, die die Intaktheit des Systems und den Wirkstoff strapazieren könnten. Zusätzlich können weitere chemische und physikalische Prozessparameter, wie beispielsweise der pH-Wert, der Druck oder die Synthesetemperatur, die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und dem übrigen System ungewollt beeinflussen oder die Wirkung des Therapeutikums beeinträchtigen.⁸⁷

Chemische Prozesse – Polymerisationsreaktionen

Industriell wird verstärkt mit der Methode der Emulsionspolymerisation gearbeitet. Sie wird hauptsächlich angewendet, um biomedizinische Diagnostika und Kosmetika herzustellen. Für die Produktion von Drug-Delivery-Systemen wird diese Methode jedoch eher selten genutzt.¹¹⁷

Hierbei wird das hydrophobe Monomer in einer wässrigen Tensidlösung dispergiert. Die Größe der resultierenden Monomertropfen variiert zwischen 1 und 10 μm . Da die Tensidkonzentration den Wert der kritischen Mizellbildungskonzentration übersteigt, liegen in der Lösung neben den Monomertropfen auch Mizellen sowie monomergequollene Mizellen vor. Die Polymerisation verläuft radikalisch und findet vorwiegend in den Mizellen statt, so dass das Monomer eine gewisse Wasserlöslichkeit aufweisen muss, um von den Tropfen zu den Mizellen zu diffundieren, damit Polymerpartikel gebildet werden können.¹²⁵

Mittlerweile beruhen eine ganze Reihe optionaler Formulierungstechniken auf der Verwendung nanometrisch skaliertem Emulsionen, sogenannten Nano- oder Miniemulsions-templat. Dabei handelt es sich um fein disperse Emulsionen mit einer durchschnittlichen Tröpfchengröße von 50 bis 500 nm.¹²⁶ Infolge der geringen Partikelgröße ergibt sich mit Hilfe geeigneter adsorbierter Tensidmoleküle eine besondere sterische Stabilität.⁸⁷ Zudem kann ein in den Tropfen enthaltenes osmotisches Reagenz (Costabilisator) einer Veränderung der Tröpfchengrößenverteilung, sprich einer Destabilisierung durch Ostwaldreifung, entgegenwirken. Die Tropfen können als „Nanoreaktoren“ für die Bildung von Nanopartikeln fungieren. Da keine freien Mizellen vorliegen, kann eine Polymerisation entweder an der Grenzfläche zur kontinuierlichen Phase oder innerhalb der Tröpfchen selbst stattfinden. Damit übernehmen die resultierenden Polymerpartikel weitgehend sowohl die Größe als auch die Größenverteilung der ursprünglichen Monomertropfen. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit der Einkapselung eines Wirkstoffs in das Polymerpartikel größer als bei der konventionellen Emulsionspolymerisation.^{117, 127, 128} Die Reaktion erfolgt auch hier in vielen Fällen durch thermische oder photochemische Aktivierung von Radikalen bzw. Startermolekülen, die in den Tropfen enthalten sein können oder nachträglich zur kontinuierlichen Phase hinzugegeben werden. Hierbei besteht jedoch das Risiko, die häufig relativ empfindlichen, einzulagernden

aktiven Stoffe durch Interaktion mit Initiatormolekülen und/oder durch die energiereiche Bestrahlung zu zerstören bzw. sie in ihrer Wirkung zu beeinträchtigen.⁸⁷ Alternativ werden in der Literatur „sanftere“ Polymerisationstypen vorgeschlagen, die über einen an- oder kationischen Reaktionsmechanismus verlaufen oder über eine Polyaddition oder -kondensation ermöglicht werden.^{125, 127} Oftmals werden die Templatbildung und die Partikelerzeugung zu einem einstufigen Prozess kombiniert.^{87, 98, 117} Bei der Präparation der Nanoemulsion an sich unterscheidet man zwischen energetisch ungünstigen Methoden, bei denen die Emulsion durch die Erzeugung von hohen Scherkräften mittels Ultraschall oder Hochdruckhomogenisierung hergestellt wird, und energetisch vorteilhaften Verfahren unter Ausnutzung des beispielsweise in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Prozesses der spontanen Emulgierung.⁸⁷ Eine weitere interessante energiesparende Technik ist die sogenannte PIT-Methode bzw. einfach nur PIT (Phase Inversion Temperature), die gegen Ende der 60er Jahre von Kōtō Shinoda und Hiroshi Saito publiziert wurde.¹²⁹ Diese Methode bedient sich der temperaturabhängigen Änderung der Affinität ethoxylierter Emulgatoren zu wässriger und Ölphase, wodurch sich beim Abkühlen einer höher temperierten W/O- Emulsion eine fein disperse O/W-Emulsion entwickelt. Doch trotz ihrer vollständig lösemittelfreien sowie schonenden und energiesparenden Herstellungsweise wird dieses Verfahren nur selten für die Präparation polymerer Nanopartikeldispersionen angewendet.

Bezüglich der Synthese von Nanopartikeln aus Polyalkylcyanacrylaten hat sich im Besonderen die Grenzflächenpolymerisation, aufbauend auf den Arbeiten von P. Couvreur und N. Al Khouri Fallouh, für die gezielte Erzeugung von Nanokapseln etabliert. Die wesentlichen Vorteile dieser Polymerisierungstechnik liegen in einer sehr effizienten Wirkstoffeinkapselung und der Polymerisation des Monomers *in situ*, wodurch sich eine präzisierte Ausbildung der Polymermembran entsprechend der Kontur der dispergierten Phase (Öltröpfchen bzw. Wassertröpfchen bei W/O-Emulsionen) ergibt. Im ersten Schritt wird eine organische Lösung aus einem Öl (und darin enthaltendem Wirkstoff bzw. gelöster aktiver Substanz) und dem Monomer (z.B. *n*-Butylcyanacrylat) in einer wässrigen Tensidlösung emulgiert. Im zweiten Schritt verursacht ein zur wässrigen Phase hinzugegebener oder enthaltender Initiator (z.B. Hydroxidionen) die Polymerisation der monomeren Bausteine an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen.^{116, 117}

Auf ähnliche Weise erfolgt die Durchführung der Grenzflächenkondensation. Hier wird im zweiten Schritt anstelle des Initiators ein weiteres hydrophiles Monomer zur wässrigen Phase gegeben. Somit können an der Grenzfläche hydrophobes und hydrophiles Monomer miteinander reagieren und eine polymere Membran um den Ölkern ausbilden.^{116, 117}

Als nachteilig für medizinische Zwecke erweist sich natürlich der Gebrauch von organischen Lösemitteln, die nach der Partikelbildung beispielsweise durch Lösemittelverdampfung unter

vermindertem Druck entfernt werden müssen. Zusätzlich können nicht vollständig abreagierte Monomer oder Oligomere toxische Reaktionen hervorrufen oder in unerwünschte Wechselbeziehung mit dem Wirkstoff treten. Dem gegenüber steht jedoch eine relativ hohe Wirkstoffeinkapselungseffizienz.^{87, 116, 117}

Physikochemische Prozesse

Überdies besteht die Möglichkeit vorab gebildete Polymere (Präpolymere) oder auch natürliche Makromoleküle, wie z.B. Chitosan oder auch Polysaccharide, zur Synthese polymerer Nanosphären und Nanokapseln einzusetzen. Hierzu kann auf verschiedene Präparationstechniken zurückgegriffen werden. Dabei konzentriert man sich im Speziellen auf Emulsions-Diffusionsprozesse sowie auf das Verfahren der Nanopräzipitation.⁹⁸ Zudem werden in der Literatur die Methode der Emulgierung und Lösemittelverdampfung, die Doppelemulsionstechnik, als Sonderfall für die Einkapselung hydrophiler Wirkstoffe, wie Proteine oder Peptide, und das Aussalzen diskutiert.^{88, 117, 130, 131} Auf die drei vorstehend genannten Methoden soll aber im weiteren Verlauf nicht näher eingegangen werden. Der interessierte Leser sei an dieser Stelle auf die angegebene Literaturreferenz verwiesen.

Emulsions-Diffusionsprozess

Auch hierbei handelt es sich um einen zweistufigen Prozess. Der erste Schritt besteht aus der Erzeugung einer Emulsion des O/W-Typs auf konventionelle Weise. Die organische Phase enthält dabei das Polymer und alle anderen notwendigen Bestandteile, gelöst in einem organischen Lösemittel, welches teilweise mit der wässrigen, kontinuierlichen Phase mischbar ist. Sind beide Phasen gesättigt, wird das thermodynamische Gleichgewicht durch weitere Zugabe von Wasser gestört. Dadurch kommt es zu einer Untersättigung der wässrigen Phase, was dazu führt, dass das Lösemittel aus den Emulsionstropfen in die äußere Phase diffundiert. Dies induziert die Fällung des Polymers, da es in der externen Phase nicht löslich ist.¹³⁰ Ist neben dem Polymer ein Öl innerhalb der organischen Phase gelöst, das sich ebenfalls nicht mit dem Dispersionsmittel mischt, bilden sich Kapselstrukturen aus. Andernfalls entstehen Nanosphären.¹¹⁷ Als weitere Konsequenz des diffusiven Lösemittelverlustes in der dispersen Phase tritt eine Verringerung der Tröpfchengröße ein. Auf diesem Weg ist es möglich, aus einer recht groben, mikrodispersen Emulsion nanometerskalige Partikeldispersionen herzustellen. So ist es der Arbeitsgruppe um David Quintanar-Guerrero Ende der 1990er Jahre gelungen, biologisch abbaubare Nanokapseln aus Polylactid (PLA) mit einem inneren Ölkern (Miglyol) herzustellen.¹³² Entsprechend funktioniert die Synthese auch ohne den Zusatz eines Öls, um PLA-Nanosphären zu erzeugen. Ebenso stellten Delphine Moinard-Checot et al. Poly- ϵ -caprolacton(PCL)/Miglyol-Nanokapseln mit Durchmessern um 450 nm dar.¹¹⁷ Typische, für diese Zwecke geeignete, organische Lösemittel sind

zum Beispiel Ethylacetat, Benzylalkohole oder Methylethylketone. Bei den verwendeten Polymeren werden neben den bereits genannten Materialien auch häufig Polylactid-co-Glycolid (PLGA) oder Ethylcellulose verwendet.^{117, 133} Als Wirkstoff konnte beispielsweise das Analgetikum Indomethacin in PLGA-Nanosphären eingelagert werden.¹³³ Die Vorteile der Emulsion-Diffusion liegen in einer zufriedenstellenden Einkapselungs- respektive Beladungseffizienz großer Mengen aktiver Substanz in die Polymerpartikel sowie in einer relativ sicheren Kontrolle der Partikelgröße. Der Gebrauch energiereicher Scherkräfte für die Generierung der transienten Emulsion und die nachträgliche Lösemittelentfernung bzw. weitere potenzielle Aufarbeitungsschritte sind hingegen zu optimieren.

Nanopräzipitation – Lösemittelverschiebung

Hierzu wird zunächst eine Polymerlösung hergestellt und diese in ein großvolumiges Präzipitationsmedium (Nichtlösemittel für das Polymer) überführt. In Analogie zum Prozess der spontanen Emulgierung ist Letzteres mit dem Lösemittel der Polymerlösung, in der Regel ein Alkohol oder Keton, vollständig mischbar. Infolge der resultierenden Lösemitteldiffusion fällt das Polymer aus und bildet die Nanopartikel. Häufig verwendete synthetische, biologisch abbaubare Polymere sind Polymilchsäure, Polycaprolacton oder Polyalkylcyanacrylate (PACA). Ebenso werden natürliche Makromoleküle, wie zum Beispiel Gelatine, Gummi arabicum oder Ethylcellulose, eingesetzt.^{117, 134} Wie beim Emulsions-Diffusionsprozess können durch Zugabe eines Öls zur organischen Phase Nanokapseln mit Kern-Schale-Struktur erhalten werden.¹³⁵ Häufig bezieht man sich in diesem Zusammenhang auf die Arbeiten von Hatem Fessi et al., die gegen Ende der 1980er Jahre großen Erfolg bezüglich der Einkapselung verschiedenster aktiver Stoffe in eine Reihe von Polymerpartikeln verzeichnen konnten.¹³⁶ Sie starteten mit dem Einschluss von Indomethacin in Polylactidnanokapseln mit einer 100%igen Einkapselungseffizienz und einem durchschnittlichen Durchmesser von rund 230 nm. Die Kapseln hielten einer siebenmonatigen Stabilitätskontrolle stand und zeigten weder eine Veränderung in der Größenverteilung noch im Wirkstoffgehalt. Darüber hinaus sind unter anderem Polyvinylacetat (PVA) und Polyvinylchlorid (PVC) als Wandmaterial und die Arzneistoffe Ciclosporin und Paclitaxel wie auch das Kontrastmittel Ethiodol als Wirkstoff getestet worden. Entsprechend wurde bei der Synthese von Polylactidnanokapseln mit Diclofenac als Therapeutikum in Miglyol bzw. Benzylbenzoat durch Silvia S. Guterres et al. vorgegangen.¹³⁷

Eingeschränkt wird Nanopräzipitation durch die starke Verdünnung der Partikeldispersion aufgrund des hohen Wasseranteils, so dass die Ausbeute an Nanopartikeln relativ gering ist. Zudem besteht die Notwendigkeit, das überschüssige Dispersionsmedium in einem nachfolgenden Schritt zu entfernen. Ebenso müssen (toxische) Lösemittel mittels Verdampfung unter vermindertem Druck eliminiert werden, was diese jedoch mit fast allen anderen Methoden

gemein hat. Eine weitere Herausforderung stellt der Vorgang der spontanen Emulgierung an sich dar. Für eine erfolgreiche Umsetzung muss der Prozess innerhalb des stabilen Ouzo-Bereichs stattfinden (siehe dazu Kapitel 2.2.2.3), ansonsten kann es zur Ausbildung unerwünschter größerer, instabiler Aggregate kommen, wie es in Experimenten von Julien Aubry et al. bei der Synthese von Polymethylmethacrylat(PMMA)-Nanopartikeln beobachtet werden konnte.⁹¹ Dem gegenüber stehen jedoch eine unkomplizierte Handhabung in der Syntheseführung sowie der Verzicht auf hochenergetische und damit kostenträchtige Emulgierv Verfahren. Gleichzeitig sind die Resultate mit einem hohen Grad an Monodispersität reproduzierbar. Des Weiteren erleichtern die geringe Stabilisatorkonzentrationⁱ und die Möglichkeit der Erzeugung von Nanokapsel- oder Nanosphären mit einer hohen Beladungskapazität auf Wasserbasis ihren Einsatz im medizinischen Bereich.^{113, 130}

Nach einer Reinterpretation von François Ganachaud lassen sich einige der angewendeten Präparationstechniken nach dem derzeitigen Kenntnisstand auf der Grundlage der spontanen Emulgierung bzw. der spontanen Polymerisation erklären und auf das Phänomen des Ouzo-Effekts zurückführen.⁸⁸ Auch die in dieser Arbeit bevorzugte Synthesestrategie basiert auf der Methode der spontanen Emulgierung und ist an das Verfahren der Nanopräzipitation angelehnt. Angeknüpft an die Thematik künstlicher Sauerstoffträger für den Blutersatz richtet sich der Fokus sowohl auf die Entwicklung eines adäquaten Herstellungsverfahrens für perfluorcarbongefüllte Nanokapseln und ihre potentielle Beladung mit Sauerstoff als auch auf die analytischen Charakterisierungsmöglichkeiten der Kapselmorphologie sowie erste exemplarische Perfusionstests am Rattenlebermodell. Die große Schwierigkeit besteht in der Einkapselung des Perfluorcarbons, hier Perfluordecalin. Aufgrund der extrem schlechten Löslichkeit der Fluorverbindung für polare und unpolare Stoffe besteht das primäre Ziel darin, ein geeignetes Synthesemedium in Verbindung mit der entsprechenden Synthesetechnik zu finden. Als vielversprechend hat sich dabei die Umsetzung in einem Lösemittelgemisch aus partiell chlorierten Kohlenwasserstoffen und Aceton herausgestellt. Darauf aufbauend ist es nun möglich, Perfluordecalin mit Hilfe von Butylcyanacrylat bzw. Polylactid-co-Glycolid durch den Prozess der Lösemittelverschiebung einzukapseln. Im Anschluss daran erfolgt die Sauerstoffbeladung durch externe Begasung der wässrigen Dispersion mit einer in der Arbeitsgruppe selbstkonstruierten Anlage und ihre Überprüfung mittels kernresonanzspektroskopischer Untersuchungsmethoden. Die Partikelgröße, die Größenverteilung und die Oberflächenstruktur können durch visuelle Verfahren wie der Dunkelfeldmikroskopie und der Rasterkraftmikroskopie analysiert werden. Anhand von Perfusionsversuchen an einer Rattenleber werden erste klinische Tauglichkeitstests der Kapselpräparate vorgenommen, um Auf-

ⁱ Geladene Polymere können Tenside ersetzen.

schluss über ihre physiologischen und metabolischen Eigenschaften sowie über ihre Zirkulationsfähigkeit und Stabilität zu erhalten.

3. Experimentelle Arbeit

3.1 Darstellung perfluorcarbongefüllter PBCA- und PLGA- Nanokapseln (mittels Ouzomethode)

3.1.1 Synthesegrundlagen

Zur Präparation der Nanokapseldispersionen wird die Synthesetechnik des Ouzo-Effekts bzw. der Nanopräzipitation aufgegriffen. Wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 erläutert, fußt sie auf der Grundlage der spontanen Emulgierung. Jenes Prinzip erfordert hinsichtlich seiner technischen Ausführung zuvorderst die Erzeugung einer binären Lösung einer gewählten Substanz, gelöst in einem Lösemittel, das sich mit einer dritten hinzuzufügenden Komponente vollständig mischt. Der gelöste Stoff ist darin unlöslich und fällt bei lokaler Übersättigung in Form kleiner Tropfen aus.

Für die gegebene Synthese ist das spezifische Löslichkeitsverhalten von Perfluorcarbonen zu berücksichtigen. Abhilfe bietet eine Mischung aus mehreren gebräuchlichen, teils halogenierten Lösemitteln. Als Perfluorcarbon wird Perfluordecalin verwendet. Eine weitere Abänderung vom Leitprozess (nach S. A. Vitale und J. L. Katz [90]) betrifft die Einführung eines Mono- oder Polymers mit dem Ziel, die produzierten PFC-Tropfen in eine polymere Membran einzuschließen, sprich einzukapseln. Auch hier wird eine vollständige Löslichkeit des späteren Wandmaterials in der organischen Phase vorausgesetzt. Als Monomer wird *n*-Butyl-2-cyanacrylat eingesetzt. Seine Polymerisation erfolgt in Gegenwart von nucleophilen Anionen, wie z.B. Hydroxidionen, weshalb eine wasserfreie Herstellung der organischen Lösung wichtig ist, um eine vorzeitige Polymerisation zu unterbinden. Zur Stabilisierung der Kapseln wird das amphiphile Blockcopolymer Synperonic F68 verwendet, welches sowohl in der organischen als auch in der wässrigen Phase gelöst wird.

Als Präparationsapparatur dient eine simple Kombination aus einem Standzylinder, in dem die wässrige Phase vorgelegt wird und einer Art Trichtersystem, über das die organische Phase zügig zugeführt werden kann. Die Trivialität der praktischen Umsetzung kann der nachstehenden schematischen Darstellung entnommen werden.

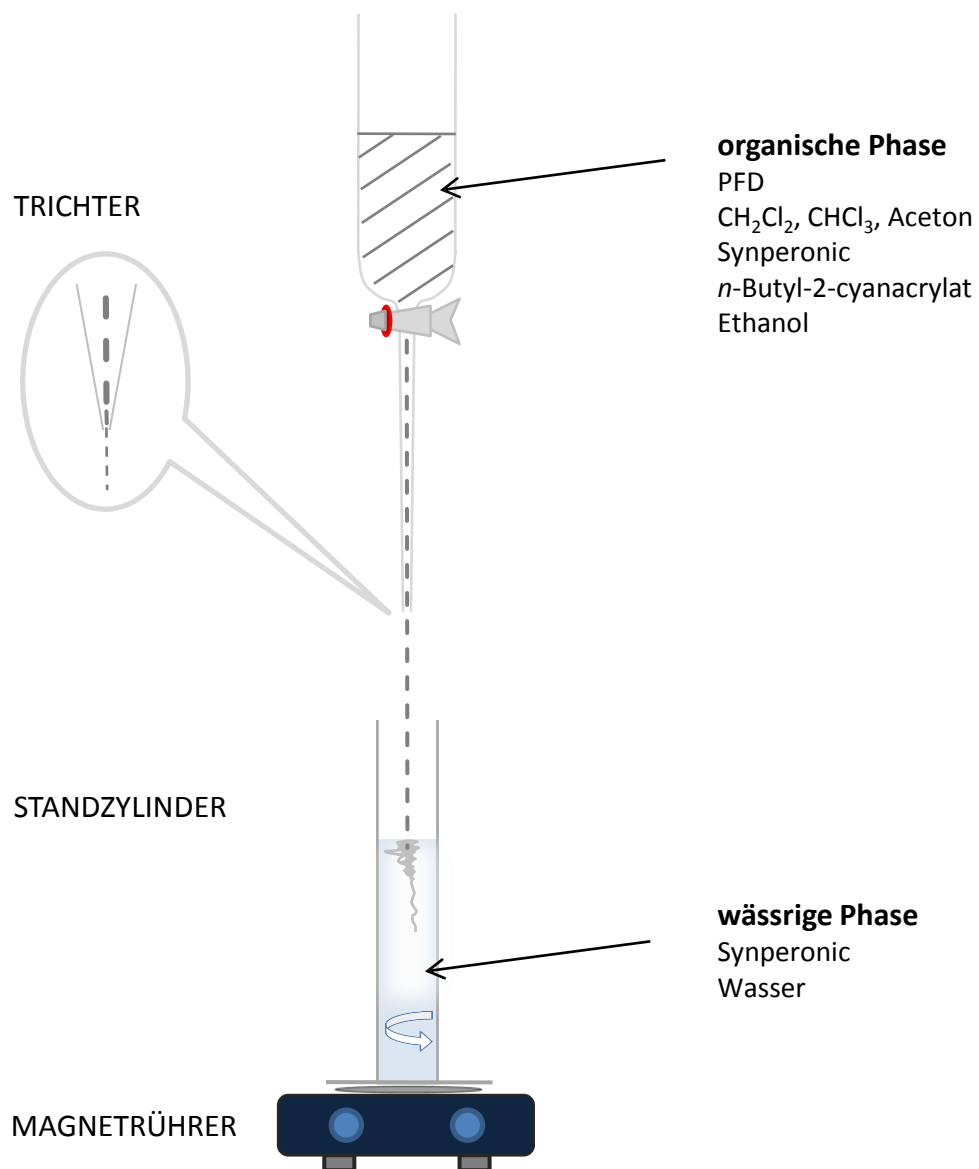


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Synthese perfluorodecalingefüllter Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln mittels des Ouzo-Effekts.

3.1.2 Präparation perfluorodecalingefüllter PBCA-Nanokapseln

Probenbezeichnung: $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}^j$

Verwendete Substanzen:

- Perfluorodecalin
- Methylenchlorid
- Chloroform

^j Erläuterungen zu den jeweiligen Abkürzungen für die Proben- sowie Messungsbezeichnungen sind am Ende der Arbeit zu finden.

- Aceton
- Synperonic
- *n*-Butyl-2-cyanacrylat
- abs. Ethanol
- dest. Wasser

200 μ l Perfluordecalin werden in einem Lösemittelgemisch durch aufeinanderfolgende Zugabe von 1 *ml* Chloroform, 1 *ml* Methylenchlorid und 10 *ml* Aceton unter intensivem Rühren gelöst. Anschließend werden darin ungefähr 61 *mg* Synperonic gelöst. Dann werden 100 μ l des Monomers hinzugegeben und die Lösung mit Ethanol auf 50 *ml* aufgefüllt. Für die wässrige Phase werden 50 *ml* einer 0,5%igen Synperoniclösung in destilliertem Wasser hergestellt. Nun wird die organische Lösung über den „Trichter“ in einem Schritt in die wässrige Tensidlösung geleitet, welche zeitgleich mittels eines Magnetrührers auf höchstmöglicher Stufe gerührt wird. Nach vollendeter Überführung werden die Lösemittel am Rotationsverdampfer bei einer maximalen Wasserbadtemperatur von ca. 40 °C und einem Unterdruck von ~ 80 *mbar* vorsichtig abdestilliert und die milchig-weiße Dispersion auf ein Volumen von ungefähr 10 *ml* eingengt. Zuletzt wird das Konzentrat über einen Glasfildertiegel (Porengröße 4, 10–16 μ m) filtriert.

Neben den Nanokapseln aus Polybutylcyanacrylat wird der Versuch zudem mit einem weiteren Polymer, Polylactid-co-Glycolid (PLGA), durchgeführt, das aus natürlichen Monomereinheiten besteht. Die präparative Arbeit verläuft prinzipiell analog.

3.1.3 Präparation perfluordecalingefüllter PLGA-Nanokapseln

Probenbezeichnung: nk(O)_{PLGA/PFD}

Verwendete Substanzen:

- Perfluordecalin
- Chloroform
- Methylenchlorid
- Aceton
- Synperonic
- Polylactid-co-Glycolid
- abs. Ethanol
- dest. Wasser

200 μ l Perfluordecalin werden unter Rühren nacheinander mit jeweils 1 ml Chloroform und Methylenchlorid versetzt und mit Aceton auf 40 ml aufgefüllt. Anschließend werden darin rund 61 mg Synperonic gelöst. Dann werden 10 mg PLGA hinzugegeben. Nachdem sich das Polymer gelöst hat, lässt man langsam ca. 8 ml Ethanol entlang der Gefäßwand in die Lösung fließen. Dabei kann eine leichte Schlierenbildung beobachtet werden, die durch nachfolgende Zugabe von ungefähr 10 ml Aceton wieder aufgehoben werden kann. Für die wässrige Phase werden 50 ml einer 0,5%igen Synperoniclösung in destilliertem Wasser verwendet. Nun wird die organische Lösung über den „Trichter“ in einem Schritt in die wässrige Tensidlösung geleitet, welche zeitgleich mittels eines Magnetrührers auf höchstmöglicher Stufe gerührt wird. Nach vollendeter Überführung werden die Lösemittel am Rotationsverdampfer bei einer maximalen Wasserbadtemperatur von ca. 40 °C und einem Unterdruck von ~ 80 mbar vorsichtig abdestilliert und die milchig-weiße Dispersion auf ein Volumen von ungefähr 10 ml eingengt. Zuletzt wird das Konzentrat über einen Glasfaltertiegel (Porengröße 4, 10–16 μ m) filtriert.

Für die Beurteilung der Ergebnisse sowie der Effizienz dieser Präparationsmethode und zum Vergleich verschiedener Parameter (Partikelgrößen, Größenverteilungen, Kraftkonstanten) werden Resultate bereits studierter, ölgefüllter Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln herangezogen. Zum gleichen Zweck wird eine alternative Synthesemethode für die Herstellung perfluorcarbongefüllter Polylactid-co-Glycolid-Nanokapseln in Augenschein genommen.

3.2 Darstellung ölgefüllter PBCA-Nanokapseln (mittels anionischer Grenzflächenpolymerisation)

3.2.1 Synthesegrundlagen

Die Präparation dieser Nanokapseldispersion erfolgt über eine durch Christian Mayer et al. überarbeitete Synthesevorschrift von N. Al Khouri Fallouh. Die organische Phase setzt sich hierbei aus zwei räumlich voneinander getrennten Komponenten (Monomer und Öl (Miglyol)) zusammen, die erst unmittelbar vor Eintritt in die wässrige Phase in einer Art Mischkammer zusammengeführt werden. Dies erfolgt mittels eines Pump-Injektions-Systems (siehe Abbildung 3.2). Durch die vorgeschaltete Separation der Komponenten kann eine unerwünschte Reaktion zwischen dem reaktiven Monomer und dem Öl bzw. potentieller, im Öl gelöster (Wirk-)Stoffe unterbunden werden. Um zudem eine frühzeitige Polymerisation zu verhindern, wird dem Monomer eine angesäuerte Ethanollösung zugesetzt. Einem dadurch bedingten Absinken des pH-Wertes der wässrigen Phase nach der Injektion der organischen Phase wird durch Zusatz einer Phosphatpufferlösung (pH 7) entgegengewirkt. Im Unterschied zur

Ouzo-Methode wird die Emulgierung aktiv, d.h. unter Verwendung eines Rotor-Stator-Rührers, vorgenommen. Hierdurch lassen sich auf engstem Raum relativ hohe Scherkräfte erzeugen. Der Rührer ist in der Weise mit dem Injektionssystem verbunden, dass sich der Auslass zwischen Rotorflügel und Statorwand befindet, so dass die organische Phase an einem Punkt höchster Scherung in die wässrige Phase eintritt.

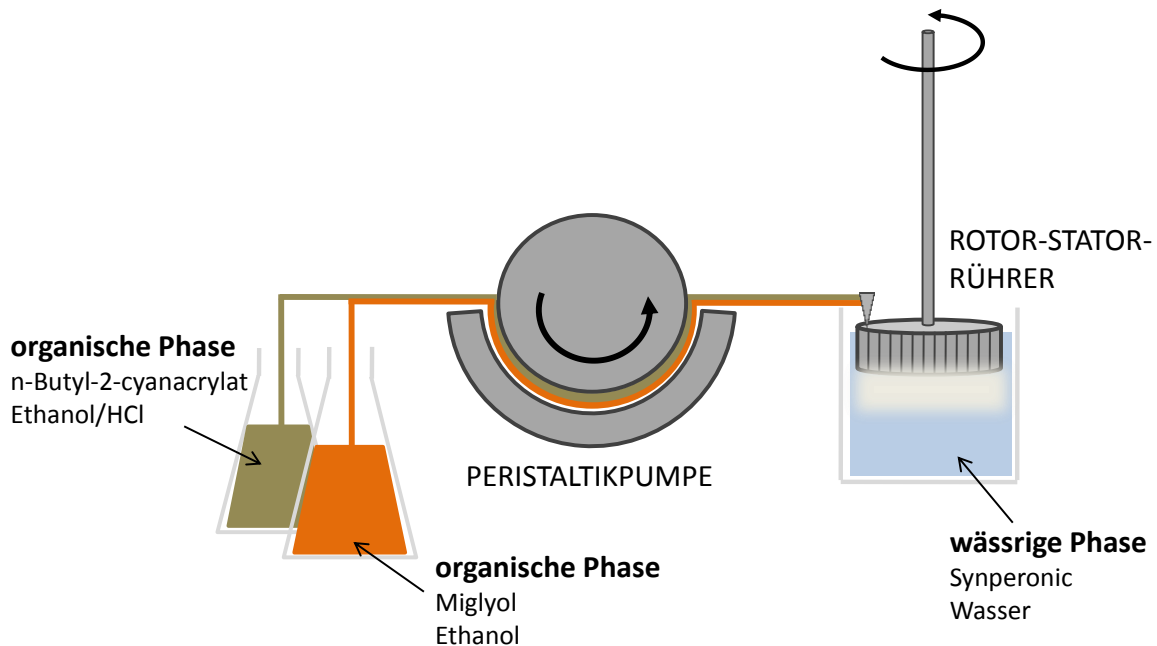


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Synthese miglyolgefüllter Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln (nach [138]).

3.2.2 Präparation miglyolgefüllter PBCA-Nanokapseln

Probenbezeichnung: $\text{nk(RS)}_{\text{PBCA/MIGLYOL}}$

Verwendete Substanzen:

- Miglyol 812N
- abs. Ethanol
- *n*-Butyl-2-cyanacrylat
- Synperonic PE/F68
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
- Dikaliumhydrogenphosphat
- Salzsäure
- dest. Wasser

Ansetzen der Pufferlösung, pH 7 (Phosphatpuffer nach Sörensen): Für einen pH-Wert von 7 werden 10,679 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit 5,444 g K_2HPO_4 in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Ansetzen der Ethanollösung: 990 *ml* Ethanol werden mit 10 *ml* 0,1 *M* HCl-Lösung versetzt.

0,5 *g* Synperonic PE/F68 werden unter mechanischem Rühren in ca. 80 *ml* destilliertem Wasser gelöst. Die entstandene Lösung wird mit 5 *ml* Pufferlösung versetzt und mit destilliertem Wasser auf insgesamt 100 *ml* aufgefüllt. Zur Darstellung der organischen Phase werden zum Einen 1,89 *g* Miglyol 821N (ca. 2 *ml*) mit Ethanol auf 12,5 *ml* aufgefüllt; zum Anderen werden 0,253 *g* *n*-Butyl-2-cyanacrylat mit 12,5 *ml* Ethanollösung versetzt. Räumlich voneinander getrennt injiziert man nun beide Komponenten mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,7 *ml/min* in die Tensidlösung. Die Rührgeschwindigkeit des Rotor-Stator-Rührers liegt bei ca. 6500 *U/min*. Nach vollendeter Überführung wird die milchige Suspension für ca. 1 *h* weitergerührt und im Anschluss über einen Glasfaltertiegel (Porengröße 4, 10–16 μm) filtriert.

Als eine alternative Präparationsmöglichkeit für perfluordecalingefüllte PLGA-Nanokapseln wird zu Beginn der experimentellen Projektarbeit eine Modifikation der Synthesetechnik nach Emilia Pisani et al. in Betracht gezogen.¹³⁹ Ihr liegt die Methode der Emulgierung und Lösemittelverdampfung zugrunde (siehe Kapitel 2.2.3.2).

3.3 Darstellung perfluorcarbongefüllter PLGA-Nanokapseln (mittels Lösemittelverdampfung)

3.3.1 Synthesegrundlagen

Wie es der Name schon sagt, handelt es sich hierbei um ein Verfahren bei dem zunächst eine Emulsion hergestellt wird und im Anschluss daran das Lösemittel verdampft respektive entfernt wird. Damit verringert sich die Löslichkeit des Polymers in der organischen Phase und führt an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen durch ein Verschmelzen und erneutes Ausbreiten der Polymertröpfchen zu einem Einschluss des Perfluorcarbons.¹³⁹

Zur Überführung der organischen Phase wird auch in diesem Fall die peristaltische Pumpe genutzt und ihre Emulgierung in der wässrigen Tensidlösung mittels Rotor-Stator-Rührer eingeleitet, so dass sich für den Aufbau ein ähnliches Schema wie zuvor ergibt.

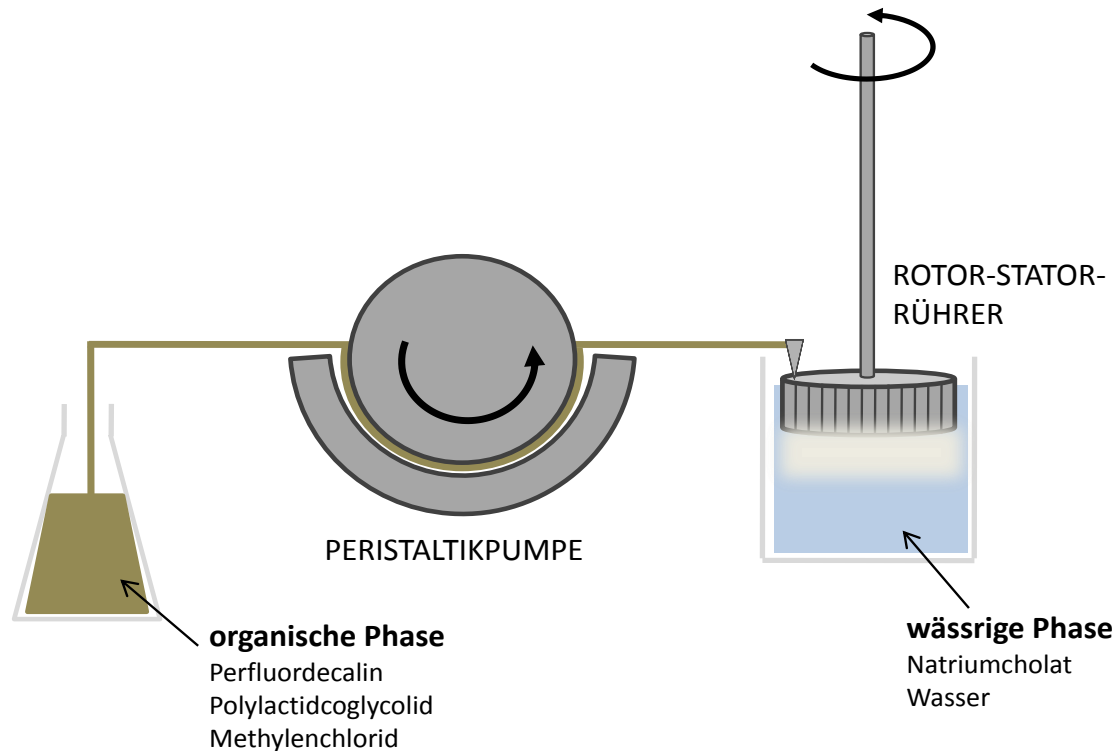


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Synthese perfluordecalingefüllter Poly(lactid-co-Glycolid)-Nanokapseln mittels der Lösemittelverdampfungstechnik.

3.3.2 Präparation perfluordecalingefüllter PLGA-Nanokapseln

Probenbezeichnung: nk(LV)_{PLGA/PFD}

Verwendete Substanzen:

- Perfluordecalin
- Methylenchlorid
- Natriumcholat
- Poly(lactid-co-Glycolid)
- dest. Wasser

Für eine 3%ige Tensidlösung werden 1,5 g Natriumcholat unter mechanischem Rühren in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. Parallel werden 0,15 g PLGA in 10 ml Methylenchlorid gelöst und anschließend mit 75 μ l Perfluordecalin versetzt. Die organische Phase wird mit Hilfe der Pumpe in die wässrige Natriumcholatlösung injiziert (Pumpgeschwindigkeit 0,7 ml/min) und mittels Rotor-Stator-Rührer mit einer Rührgeschwindigkeit von 6500 U/min emulgiert. Nach erfolgter Zugabe wird die Dispersion auf gleiche Weise für weitere 60 Minuten gerührt. Um ein stetiges Verdampfen des Lösemittels zu gewährleisten, wird die Dispersion unter leichtem mechanischem Rühren unverschlossen aufbewahrt.

3.4 Optimierung der Ouzomethode zur Herstellung perfluordecalingefüllter PBCA-Nanokapseln

3.4.1 Optimierung durch Reduzierung der Polymer- und Tensidmenge

Im Bemühen um eine künftige klinische Anwendung ist es nun erstrebenswert, die entwickelte Synthesestrategie in Kapitel 3.1.2 dem biologischen Anspruch anzugleichen und die gewählten chemischen Syntheseparameter auf ein biokompatibles und zugleich effektiv bleibendes Maß herunterzuschrauben. Dazu werden der Monomer- und Tensidgehalt soweit herabgesetzt, dass Kapseln mit einer möglichst dünnen, aber dennoch festen Polymerhülle in stabiler Dispersion produziert werden können. Für die Optimierung wird eine neunteilige Versuchsreihe angesetzt, die gleich einer statistischen Versuchsplanung eine unabhängige, graduelle Reduktion jener synthesechemischen Parameter innerhalb einer quadratischen Matrix erlaubt.

$$A = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{bmatrix}$$

Während die Verminderung der Tensidkonzentration dem Spaltenvektor folgt, verläuft die Verringerung des Monomeranteils über den Zeilenvektor. Daraus ergibt sich für die anstehenden Versuchsansätze folgende Einteilung:

Ansatz a_{11} :	100 μ l BCA	0,5%ige Tensidlösung	61 mg Synperonic
Ansatz a_{12} :	50 μ l BCA	0,5%ige Tensidlösung	61 mg Synperonic
Ansatz a_{13} :	10 μ l BCA	0,5%ige Tensidlösung	61 mg Synperonic
Ansatz a_{21} :	100 μ l BCA	0,25%ige Tensidlösung	30,5 mg Synperonic
Ansatz a_{22} :	50 μ l BCA	0,25%ige Tensidlösung	30,5 mg Synperonic
Ansatz a_{23} :	10 μ l BCA	0,25%ige Tensidlösung	30,5 mg Synperonic
Ansatz a_{31} :	100 μ l BCA	0,1%ige Tensidlösung	12,2 mg Synperonic
Ansatz a_{32} :	50 μ l BCA	0,1%ige Tensidlösung	12,2 mg Synperonic
Ansatz a_{33} :	10 μ l BCA	0,1%ige Tensidlösung	12,2 mg Synperonic

Die weitere Versuchsführung läuft unter Berücksichtigung der veränderten Parameter entsprechend der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Synthesevorgaben ab.

Probenbezeichnung: nk(O^{Opti} a_{ij})_{PBCA/PFD}

Des Weiteren werden zu Ansatz a_{33} eine korrespondierende Emulsion, **emu(O^{Opti1} a_{33})_{PFD}**, und eine korrespondierende Nanosphärendispersion, **ns(O^{Opti1} a_{33})_{PBCA}**, hergestellt. Die Versuchsdurchführung verläuft entsprechend ohne Monomer- bzw. Perfluordecalinzusatz. Mittels der bildgebenden Charakterisierungsmethoden sollte es so möglich sein, Unterschiede zwischen den einzelnen Partikelstrukturen aufzudecken und die Eigenart der Kapselnatur deutlicher hervorzuheben.

3.4.2 Optimierung durch technische und präparative Variation der Ouzomethode

Parallel werden Versuche unternommen, den bestehenden Ansatz (siehe Kapitel 3.1.2) stärker an die Syntheseroute, die von S. A. Vitale et al. am System DVB/Ethanol/Wasser getestet wurde, anzulehnen und sich damit dem Ouzo-Effekt in korrespondierender Weise zu nähern. In einem ersten Versuch bedeutet dies eine Änderung des Phasenverhältnisses, die Zusammenführung der beiden Phasen in umgekehrter Reihenfolge, das Aufheben der Rührbewegung und eine Reduzierung der Tensidkonzentration. In einem zweiten Versuch wird auf den Einsatz physiologisch bedenklicher Lösemittel (Chloroform, Methylenchlorid, Aceton) verzichtet und zunächst gezielt eine Emulsion hergestellt, um diese durch anschließende Zugabe von Wasser in eine Nanokapseldispersion zu überführen.

3.4.2.1 Optimierung durch Angleichung an die Syntheseroute von Vitale und Katz

Laut Literaturangaben verwenden S. A. Vitale und J. L. Katz zur Synthese ihrer Ouzo-Emulsion ein Gemisch aus Öl, Lösemittel und Wasser im Verhältnis von 1 : 100 : 900 [90]. Übertragen auf die von C. Mayer et al. entwickelte Standardsynthese in Kapitel 3.1.2 ergibt sich damit ein mengenmäßiger Anteil von 125 μ l Perfluordecalin, 12,5 ml Lösemittel und 112,5 ml Wasser am Gesamtvolumen. Hiermit werden zwei Ansätze gefahren, wobei die erste Synthese mit einem Phasenverhältnis (organische zu wässriger Phase) von 1 zu 20, die Zweite mit einem Phasenverhältnis von 1 zu 9 durchgeführt wird. Die praktische Umsetzung ist, davon abgesehen, fast identisch.

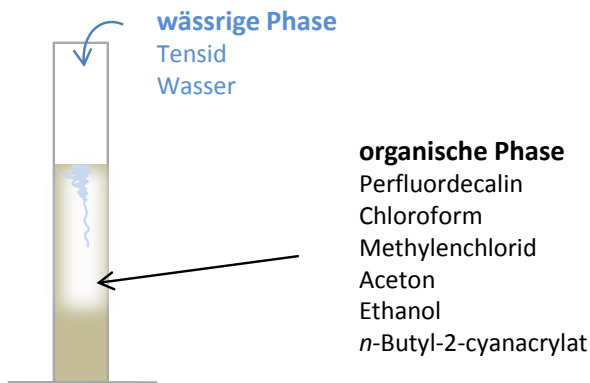


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Synthese von perfluordecalingefüllten Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln infolge der Optimierung der Synthesestrategie $\text{nk}(\text{O})_{\text{PBCA/PFD}}$ aus Kapitel 3.1.2 durch Angleichung an Literaturvorgaben von S. A. Vitale und J. L. Katz [90].

Probenbezeichnung: $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1:9})_{\text{PBCA/PFD}}$ und $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1:20})_{\text{PBCA/PFD}}$

Verwendete Substanzen:

- Perfluordecalin
- Chloroform
- Methylenchlorid
- Aceton
- abs. Ethanol
- *n*-Butyl-2-cyanacrylat
- Synperonic
- dest. Wasser

Für die organische Phase werden 125 μl Perfluordecalin vorgelegt. Unter intensivem mechanischem Rühren werden 250 μl Chloroform, 250 μl Methylenchlorid, 2,5 *ml* Aceton und 9,5 *ml* Ethanol hinzugegeben. Der klaren Lösung werden 62,5 μl *n*-Butyl-2-cyanacrylat beigefügt.

Für den ersten Ansatz (1:20) werden 0,5 *ml* der organischen Phase in einem 10 *ml* Standzylinder vorgelegt und mit 10 *ml* einer 0,5%igen, wässrigen Synperonic-Lösung versetzt. Die Dispersion wird gefiltert (Glasfiltertiegel, Porengröße 4) und am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von $\sim 40^\circ\text{C}$ und einem Druck von 38 *mbar* fast bis zur Trockene eingengt. Das Konzentrat wird mit etwas destilliertem Wasser aus dem Kolben entfernt und bei Bedarf mittels Vortexrührer redispergiert.

Für den zweiten Ansatz (1:9) werden 10 *ml* der organischen Phase in einem 100 *ml* Standzylinder vorgelegt und mit 90 *ml* einer 0,5%igen wässrigen Synperonic-Lösung versetzt. Es wird über einen Glasfiltertiegel (Porengröße 4) filtriert. Anschließend werden die Lösemittel am

Rotationsverdampfer bei $\sim 40^\circ\text{C}$ Wasserbadtemperatur und 50 mbar evaporiert und das Volumen auf ca. 10 ml eingengt.

3.4.2.2 Optimierung durch Lösemittelverzicht

Prinzipiell wird für diese Variante zunächst eine Emulsion aus Perfluordecalin in Ethanol hergestellt. Das Monomer wird zuvor in der Ethanolphase gelöst und seine Reaktivität durch Ansäuern gehemmt. Erst durch kontrollierte Zugabe von Wasser wird die Polymerisation gestartet und das System durch Verdampfen des Lösemittels in eine wässrige Dispersion überführt. Die Bildung der Emulsion wird mit Hilfe des Pump-Injektions-Systems, das bereits aus den Versuchen 3.2 und 3.3 bekannt ist, durchgeführt. Ein schematischer Überblick kann durch die nachfolgende Abbildung gewonnen werden.

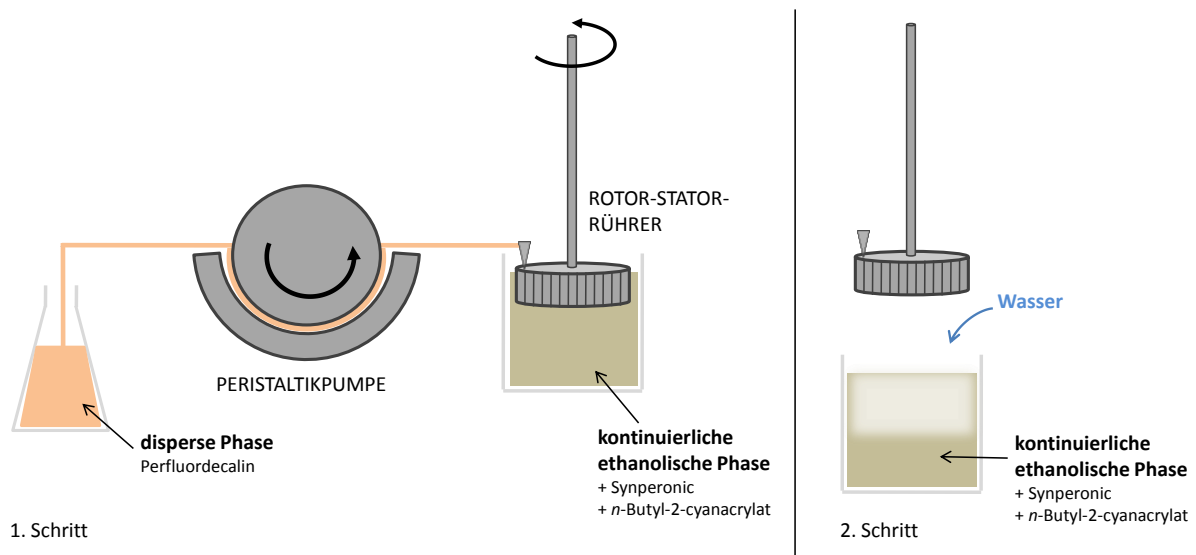


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Synthese von perfluordecalingefüllten Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln infolge der Optimierung 3 durch Lösemittelverzicht.

Probenbezeichnung: nk(RS^{Opti3}_{EtOH})PBCA/PFD

Verwendete Substanzen:

- Salzsäure
- abs. Ethanol
- Synperonic
- *n*-Butyl-2-cyanacrylat
- Perfluordecalin
- dest. Wasser

Für die angesäuerte alkoholische Lösung werden 1 ml 0,1 M Salzsäure mit Ethanol auf 100 ml aufgefüllt. Unter starkem Rühren werden knapp 20 mg Synperonic PE68 hinzugegeben.

Da sich das Tensid nur äußerst schlecht löst, wird die leicht trübe Suspension gefiltert, so dass man eine klare Ethanollösung unbekannter Tensidkonzentration erhält. Davon werden 50 ml in einem Becherglas vorgelegt und 4,6 mg *n*-Butyl-2-cyanacrylat unter Rühren hinzugefügt. Dann werden der Lösung über die Pumpe 500 µl Perfluorodecalin zugeführt und auf höchster Stufe gerührt (Pumpgeschwindigkeit: 0,4 ml/min, Rotor/Statorgeschwindigkeit: 10000 U/min). Nach vollständiger Zugabe werden in einem Schritt 50 ml destilliertes Wasser zur Emulsion gegossen. Die leicht trübe Dispersion wird am Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingeeengt.

3.5 Charakterisierungsmethoden

Zur Charakterisierung der präparierten Partikeldispersionen kommen drei verschiedene Methoden zum Einsatz. Die Ermittlung der durchschnittlichen Partikelgröße sowie die Partikelgrößenverteilung erfolgt über ein von C. Mayer et al. entwickeltes Verfahren des Particle Tracking (PT) – eine Kombination aus einem Dunkelfeldmikroskop und digitaler Bildverarbeitung. Ein weiteres bildgebendes Verfahren stellt die Rasterkraftmikroskopie (AFM, Atomic Force Microscopy) dar. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die Oberfläche der Partikel zu detektieren und neben einer individuellen Größenbestimmung sogenannte spektroskopische Kraft-Abstands-Diagramme zu erstellen. Letztere können Aufschluss über die Elastizität der Partikelhülle geben und lassen für die Kapselstruktur charakteristische Werte erkennen. Die Kernresonanzspektroskopie (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) ist ein Standardmessverfahren und wird in vielerlei Hinsicht genutzt. Für hiesige Zwecke werden Sauerstoffmessungen durchgeführt, d.h. die perfluorcarbongefüllten Nanokapseln werden durch eine eigens dafür ausgearbeitete Technik alternierend mit Stickstoff und Sauerstoff begast und die Aufnahme und Abgabe der Gase beobachtet. Dadurch können Aussagen über die Beladungskapazität und damit über die Effektivität der Nanokapseln getroffen werden.

3.5.1 Particle Tracking

3.5.1.1 Die Methode der Dunkelfeldmikroskopie

Seit gut 100 Jahren gehört das Mikroskop zu den anerkannten Instrumenten der Wissenschaften und findet heute in unterschiedlichen naturwissenschaftlichen Bereichen, wie zum Beispiel in der Biologie, der Medizin, der Geologie oder Mineralogie seine Berechtigung.¹⁴⁰

Die Dunkelfeldmikroskopie wird zu den Methoden der Kontrastmikroskopie gezählt. Obwohl sie schon seit Beginn des 19. Jahrhunderts bekannt ist, wird die Möglichkeit zur Größenbestimmung kolloidaler Systeme erst seit einigen Jahren genutzt. In Verbindung mit dem Particle Tracking (PT) kann nach der Theorie von Albert Einstein und Marian von

Smoluchowski aus der Brown'schen Molekularbewegung die Größe dispergierter Partikel abgeleitet werden.¹⁴¹

Die Grundlage der Dunkelfeldmikroskopie bildet die Durchlicht-Hellfeldmikroskopie. Durch Ausblenden aller zur Hellfelderzeugung dienenden Strahlen erhält man ein Dunkelfeld. Dabei macht man sich die Eigenschaften der schiefen Beleuchtung zunutze. Ein Kardiodkondensor beleuchtet dazu das Objekt hohlkegelförmig von allen Seiten, was zu einer helleren Ausleuchtung führt (siehe Abbildung 3.6).

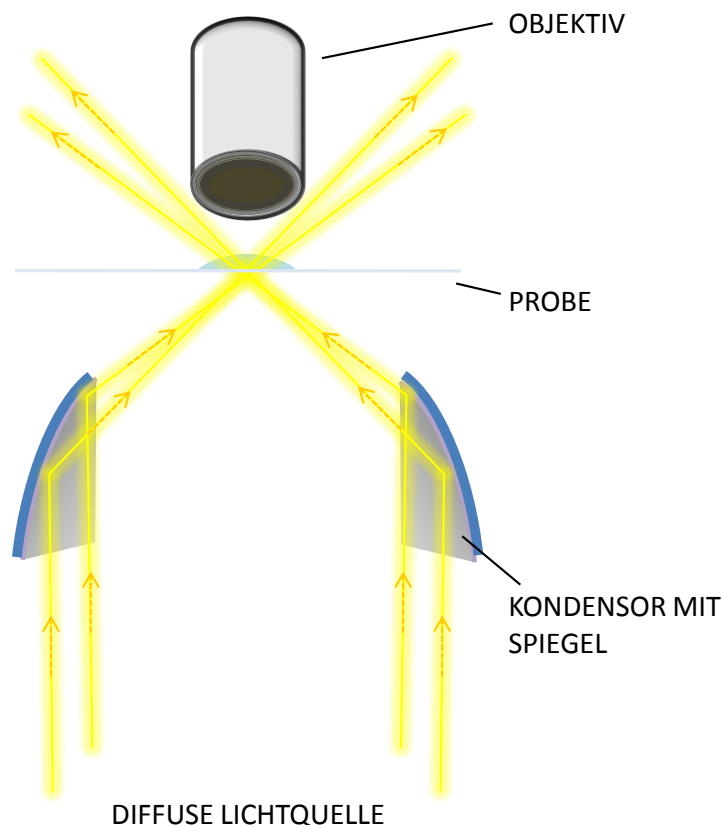


Abbildung 3.6: Aufbau und Strahlengang eines Kardiodkondensors.

Für eine optimale Differenzierung der Objekte sollte ein deutlicher Kontrast zwischen den zu beobachtenden hellen Teilchen und dem dunklen Bildhintergrund bzw. dem Umfeld gewährleistet sein. Dieser Kontrast K wird definiert als

$$K = \frac{I_{Umfeld} - I_{Objekt}}{I_{Umfeld} + I_{Objekt}}. \quad (6)$$

Hierbei ist I_{Umfeld} die Lichtintensität des Umfeldes und I_{Objekt} die Lichtintensität des Objektes. Die Lichtintensität ist direkt proportional zum Amplitudenquadrat der Lichtschwingung. Im Idealfall ist die Intensität des Umfeldes gleich Null bzw. nahe Null, so dass der Kontrast

den Wert -1 erhält. Die Objekte sind sichtbar, solange die Intensität des von ihnen ausgehenden Lichts ausreicht, um von einem Lichtempfänger, dem menschlichen Auge oder einer Kamera, wahrgenommen zu werden. Die Grenze der Sichtbarkeit bildet die Unterschiedsschwelle.¹⁴¹

3.5.1.2 Bildentstehung im Mikroskop und das Auflösungsvermögen

Nach George B. Airy werden Objekte in Selbst- und Nichtselbstleuchter unterschieden. Hierbei werden die Objekte in einzelne Punkte zerlegt, die durch Interferenz ihrer kohärenten Lichtwellen in der Zwischenbildebene jeweils ein Beugungsscheibchen erzeugen. Ein selbstleuchtendes Objekt sendet zusätzlich inkohärente Kugelwellen aus, die in der Zwischenbildebene nicht interferieren. Das betrachtete Bild setzt sich aus der Summe der einzelnen Beugungsfiguren zusammen. Die Intensität entspricht der Summe der Amplitudenquadrate.¹⁴¹

In der Regel handelt es sich bei den meisten Objekten jedoch um Nichtselbstleuchter, deren Bildentstehung komplexer verläuft. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass das Objekt von einer punktförmigen Lichtquelle aus großer Entfernung beleuchtet wird. Treffen die von der Lichtquelle ausgehenden Elementarwellen senkrecht auf das Objekt, gehen von den Punkten des Objekts zueinander kohärente Elementarwellen aus. Jeder Punkt erzeugt ein Beugungsscheibchen, welche bei Überlagerung in der Zwischenbildebene interferieren. Die Intensität des daraus resultierenden Beugungsscheibchens entspricht der Summe aller Amplituden.

Nach der Theorie von Ernst Abbe werden die von der Lichtquelle ausgehenden Elementarwellen am Objekt gebeugt und im Objektiv des Mikroskops gebündelt, wobei in der hinteren Brennebene ein primäres Interferenzbild entsteht. Die von dem primären Interferenzbild ausgehenden Elementarwellen interferieren in der Zwischenbildebene und erzeugen das sekundäre Interferenzbild. Nur durch Überlagerung aller vom primären Interferenzbild ausgehenden Elementarwellen resultiert in der Zwischenbildebene ein sekundäres Interferenzbild, welches mit dem Objekt identisch ist.¹⁴⁰

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die Bildentstehung die Interferenz mindestens zweier Beugungsmaxima eines Objektpunktes erforderlich ist. Dabei spielt das Auflösungsvermögen des Objektivs eine wichtige Rolle für die Bildqualität und damit für die spätere Auswertung der Bilder. Demnach muss der Öffnungswinkel 2σ des Objektivs groß genug sein, um möglichst viele Maxima aufnehmen zu können. Je höher die Anzahl der interferierenden Beugungsmaxima ist, desto kleiner werden die Beugungsscheibchen und umso besser ist die Auflösung. Unterschreitet man jedoch eine bestimmte Auflösungsgrenze,

so ist eine Differenzierung dicht beieinander liegender Punkte bzw. Beugungsfiguren nicht mehr möglich. Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops bestimmt also die Unterscheidbarkeit zweier benachbarter Objekte in Abhängigkeit von ihrem Abstand. Der Grenzwert, der den minimalen Abstand d_{min} zwischen zwei Objektpunkten angibt, bei dem diese gerade noch zu differenzieren sind, ist nach G. B. Airy und E. Abbe durch

$$d_{min} = \frac{\lambda}{n \cdot A_{Objektiv}} \quad (7)$$

gegeben. Dabei entspricht d_{min} dem kleinsten noch auflösbaren Gitterabstand zweier Objektpunkte, λ kennzeichnet die Wellenlänge des Mikroskoplichts, $n \cdot A_{Objektiv}$ beschreibt die numerische Apertur des Objektivs.

Unter der numerischen Apertur versteht man das Produkt aus dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Objekt und Frontlinse des Objektivs (Luft, Wasser, Immersionsöl) und dem Sinus des halben Öffnungswinkels σ des Objektivs:

$$n \cdot A_{Objektiv} = n \cdot \sin(\sigma) \quad (8)$$

Nach E. Abbe ergibt sich, dass zur Bildentstehung genau zwei Hauptmaxima (0. und 1. Ordnung) erforderlich sind. Nach G. B. Airy existiert zwischen den beiden Maxima ein eindeutiges Minimum.

Gleichung 8 gilt allerdings nur bei einer kohärenten Beleuchtung. Da Diese senkrecht zur Objektebene verläuft, ist der Einfallswinkel α des Lichts gleich Null. Bei der Dunkelfeldmikroskopie wird jedoch eine schiefe Beleuchtung verwendet. Hier ist der Einfallswinkel α größer als der halbe Öffnungswinkel σ des Objektivs. Die Elementarwellen des Lichts treffen mit einem Gangunterschied δ auf das Objekt, welcher wie folgt definiert ist:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot A_{Objektiv}} \quad (9)$$

Dabei ist zu erkennen, dass eine schiefe Beleuchtung zu einer Erniedrigung der Auflösungsgrenze und damit zu einem verbesserten Auflösungsvermögen führt. Im Unterschied zur Hellfeldbeleuchtung ist beim Dunkelfeld der Einfallswinkel größer als der halbe Öffnungswinkel des Objektivs, wodurch das nullte Beugungsmaximum an der Frontlinse vorbeifällt. Zur Bildentstehung tragen deshalb nur die Nebenmaxima bei.^{140, 141}

3.5.1.3 Brown'sche Molekularbewegung

Nachdem Robert Hook Mitte des 17. Jahrhunderts die Hypothese aufstellte, dass sich Atome und Moleküle in ständiger ungeordneter Bewegung befinden, entdeckte Robert Brown im Jahr 1827 bei Untersuchungen an Pollenkörnern, dass größere, unter dem Mikroskop noch sichtbare Teilchen in Gasen und in Flüssigkeiten unregelmäßige Zickzack- und Zitterbewegungen ausführen (siehe Abbildung 3.7). Dabei stellte er fest, dass diese Bewegungen nicht durch äußerliche Faktoren hervorgerufen werden, sondern von den Teilchen selbst stammen. Zudem beobachtete er, dass sich die Teilchen um so schneller bewegen, je kleiner sie sind.¹⁴²

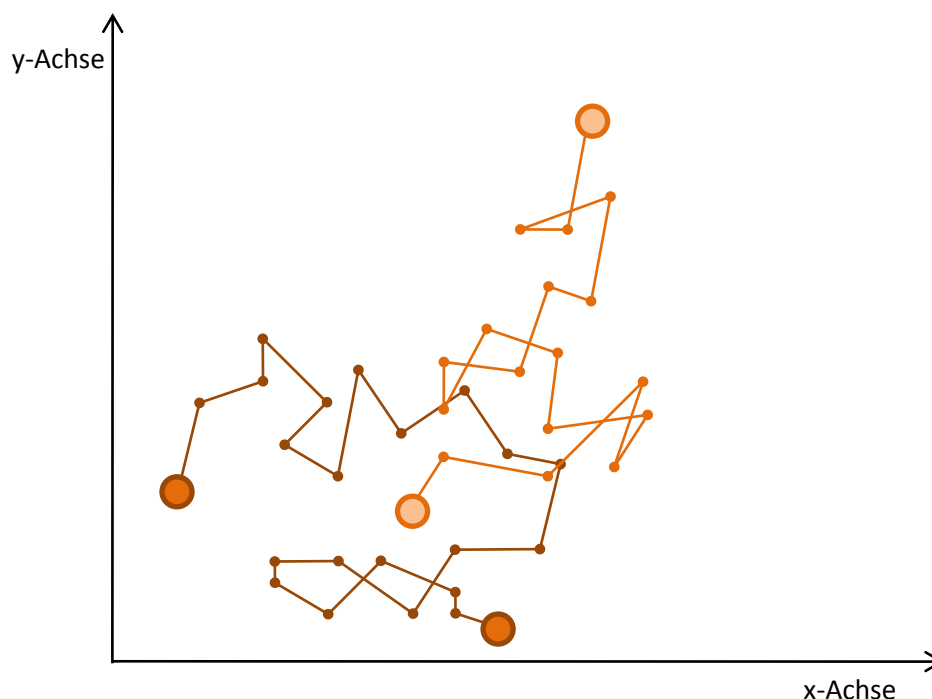


Abbildung 3.7: Zweidimensionale Darstellung der Brown'schen Molekularbewegung zweier Teilchen.

A. Einstein und M. von Smoluchowski führten diese Bewegung auf eine Reaktion der Wärmebewegung zurück und entwickelten mit Hilfe der molekularkinetischen Theorie nachstehende Gleichung:

$$r_H = \frac{R \cdot T \cdot t}{3\pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot \Delta^2} \quad (10)$$

r_H ist der hydrodynamische Teilchenradius, R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur in Kelvin. t entspricht der Diffusionszeit, in der die Teilchenbewegung beobachtet wird. Ferner sind N_A die Avogadro-Konstante, η die Viskosität der umgebenden Flüssigkeit und Δ^2 das zu erwartende Verschiebungsquadrat.

Gleichung 10 ergibt sich aus der Definition des Diffusionskoeffizienten basierend auf dem 1. Fick'schen Gesetz und dem Stokes'schen Gesetz für laminare Strömungen um eine Kugel. Dabei ist der Diffusionskoeffizient nach A. Einstein und M. von Smoluchowski wie folgt definiert:

$$D = \frac{\Delta^2}{2t} \quad (11)$$

Nach A. Einstein und George G. Stokes schreibt sich der Diffusionskoeffizient auch als:

$$D = \frac{R \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot r_H} \quad (12)$$

Durch Gleichsetzen der letzten beiden Gleichungen kommt man zu Gleichung 10. Da die Brown'sche Bewegung auf zufällige Stöße zwischen den Teilchen sowie mit der Gefäßwand zurückgeführt werden kann, wird das Verschiebungsquadrat Δ^2 bei einer ausreichenden Anzahl von Einzelmessungen durch das mittlere Verschiebungsquadrat $\overline{\Delta^2}$ ersetzt.^{140, 141}

$$r_H = \frac{R \cdot T \cdot t}{3\pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot \overline{\Delta^2}} \quad (13)$$

3.5.1.4 Das Verfahren des Particle Tracking

Basierend auf der Theorie aus der Brown'schen Bewegung dispergierter Partikel die Größe derselben zu ermitteln, stellt die Dunkelfeldmikroskopie in Verbindung mit der digitalen Bildverarbeitung eine interessante Charakterisierungsmethode dar. Durch optische Verfolgung einzelner Teilchen können somit nicht nur Einzelradien, sondern auch Radienverteilungen ermittelt werden. Dabei setzt sich das Verfahren aus vier Operationen zusammen (siehe Abbildung 3.8):

- Bildgewinnung mittels einer CCD-Kamera
- Digitalisierung durch eine Framegrabber-Karte
- Bildverarbeitung und Bildrestauration
- Bewegungsanalyse und Auswertung

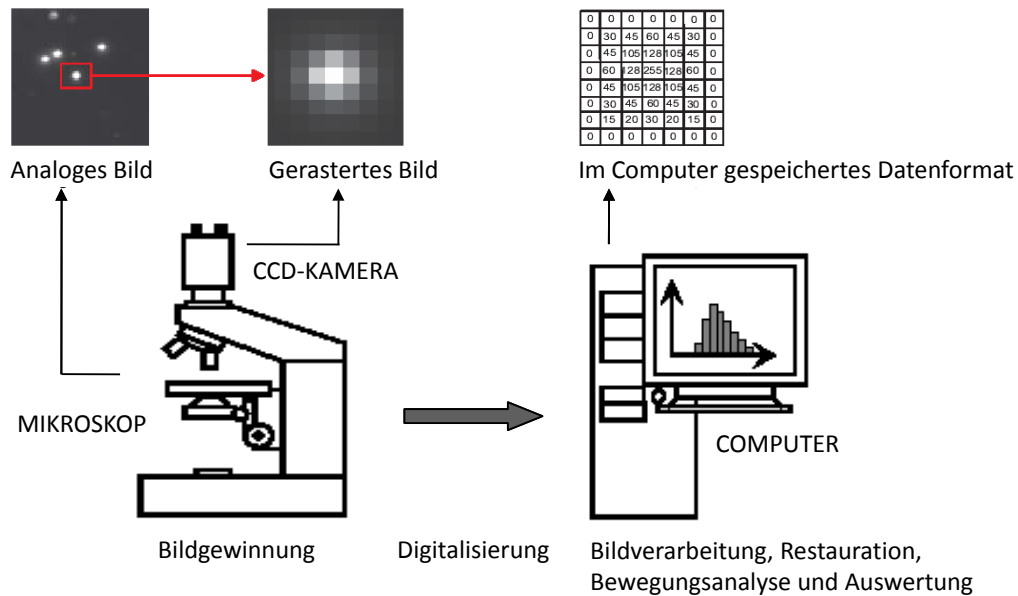


Abbildung 3.8: Technischer Aufbau des verwendeten Particle Tracking-Verfahrens (nach [140], [141]).

Bildgewinnung mittels einer CCD-Kamera

Mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera werden zunächst Bilder aus der Zwischenbildebene aufgenommen. Die Kamera enthält einen CCD-Chip, einen zweidimensionalen Sensor bestehend aus lichtempfindlichen Halbleiterelementen mit konstanter Größe. In diesen Halbleiterelementen werden bei zeitlich begrenzter Belichtung (Integrationszeit) durch auftreffende Photonen Ladungstrennungen hervorgerufen. Die Ladungen der einzelnen Pixel (picture element) werden mittels eines Rasterprogramms nach Größe und Gestalt in ein entsprechendes Spannungssignal transformiert, welches an die nachfolgende Systemkomponente weitergeleitet wird. Die Bildinformation wird dabei zeilenweise übertragen. Es wird in Halbzeilen- und Vollzeilenverfahren unterschieden. Beim Halbzeilenverfahren, welches auch in der Fernsehtechnik verwendet wird, werden zunächst alle ungeraden Bildzeilen (Reihenfolge: 1, 3, 5, ...) und anschließend alle geraden Zeilen (Reihenfolge: 2, 4, 6, ...) gesendet. Die Übertragung der beiden Halbbilder erfolgt im 50 Hz-Takt. Das Vollbild erhält man durch Überlagerung der beiden Halbbilder und wird mit 25 Hz dargestellt. Durch Bewegung hervorgerufene Verzerrungen machen das Halbzeilenverfahren zur Messung bewegter Objekte jedoch unbrauchbar. Daher wird zum Particle Tracking das Vollzeilenverfahren angewendet. Hierbei werden die Zeilen des Bildes vollständig ausgelesen (Reihenfolge: 1, 2, 3, 4, ...) und mit 25 Hz übertragen.

Digitalisierung durch eine Framegrabber-Karte

Die Framegrabber-Karte digitalisiert die übermittelten analogen Datensignale durch Transformation in ein für den Computer passendes Datenformat und speichert die Bilder als Filmsequenz ab. Die Anzahl der Bilder einer Sequenz ist abhängig vom Arbeitsspeicher der Karte. Dort werden die Bilddaten in einer Tabelle in Form einer Bildmatrix abgelegt. Festgelegt Graustufenwerte im Wertebereich von 0 bis 255 entsprechen den Helligkeitsstufen der Bildpixel, wobei Null einem unbelichteten, schwarzen Pixel und der Wert 255 einem belichteten, weißen Pixel entspricht. Daraus resultiert eine Bildmatrix B mit m mal n Graustufenwerten G :

$$B(m, n) = \begin{bmatrix} G_{1,1} & G_{1,2} & \cdots & \cdots & G_{1,m-1} & G_{1,m} \\ G_{2,1} & G_{2,2} & \cdots & \cdots & G_{2,m-1} & G_{2,m} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ G_{n-1,1} & G_{n-1,2} & \cdots & \cdots & G_{n-1,m-1} & G_{n-1,m} \\ G_{n,1} & G_{n,2} & \cdots & \cdots & G_{n,m-1} & G_{n,m} \end{bmatrix} \quad (14)$$

Bildverarbeitung und Bildrestauration

Zur Bildrestauration bedient man sich eines Subtraktionsverfahrens (SUB128). Dadurch können störende Elemente wie unbewegte Objekte im Bildhintergrund, Hintergrundrauschen oder Unschärfen aus dem Bild eliminiert werden. Beispielsweise erschwert ein sogenannter Graukeil in der linken Bildhälfte der Abbildung 3.9 das Auffinden von helleren Objekten in diesem Bereich. Durch Subtraktion des ersten Bildes der Sequenz wird die Störung entfernt und die bewegten Elemente des ersten Bildes erscheinen im manipulierten Bild als schwarze Stellen.

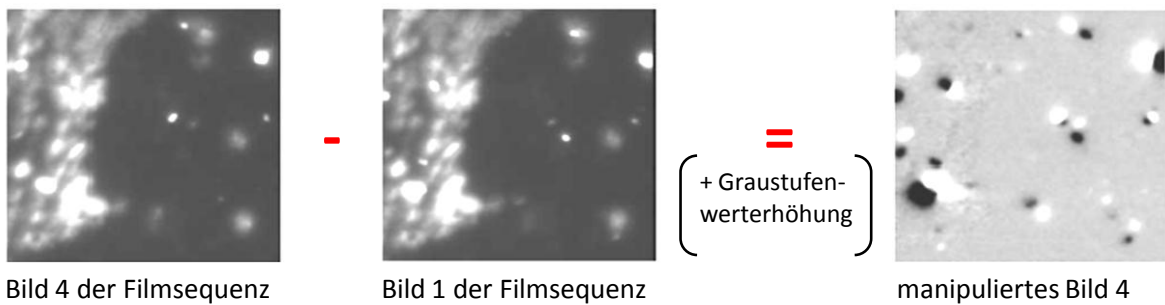


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Bildrestauration mit der SUB128-Prozedur (nach [140], [141]).

Dazu wird zunächst das erste Bild einer Sequenz in einem speziellen Referenzspeicher $B_{Referenz}$ abgelegt. Die restlichen Bilder dieser Sequenz werden nacheinander geladen und in einem Speicher, der Matrix $B_{Aktuell}$, zwischengelagert. Dabei werden die Matrizen folgender Operation unterworfen, wodurch eine neue Matrix B_{Neu} entsteht, die anschließend anstelle von $B_{Aktuell}$ gespeichert wird:

$$B_{Neu} = B_{Aktuell} - B_{Referenz} \quad (15)$$

Jedes Bild der manipulierten Filmsequenz erfährt eine Graustufenerhöhung um den Faktor 128:

$$B_{Neu} = B_{Aktuell} + 128 \cdot E \quad (16)$$

Bei der Mustererkennung werden mit Hilfe einer Objektklassifizierungsprozedur die helleren Objekte vor dem dunkleren Hintergrund erfasst und ihr Flächenschwerpunkt berechnet. Die Analyse erfolgt oberhalb eines vorgegebenen Graustufenschwellenwerts. Dazu durchläuft das Steuerungsprogramm PicColor zeilenweise jedes Bild einer Filmsequenz. Wird ein Pixel mit einem zu hohen Graustufenwert erfasst, wird das Objekt entlang des Grauschwellenwerts im Uhrzeigersinn umrundet. Zur Kennzeichnung der Position werden die Flächenschwerpunkte der gefundenen Pixel berechnet und als Tabelle in einer Datei (DAT-Liste) hinterlegt.

Bewegungsanalyse und Auswertung

Bei der Spurenanalyse bzw. dem Motion Tracking werden die Bewegungsspuren aus den korrespondierenden Positionsdaten berechnet. Nach Einlesen und Abspeichern der Tabellenwerte in den Computer können dann die hydrodynamischen Radien über die Analyse der Positionsdaten ermittelt werden. Dazu zieht man die Einsteinsche Gleichung 13 der hydrodynamischen Radienberechnung heran. Anschließend werden alle berechneten Radien in einem Histogramm zusammengefasst.^{140, 141}

3.5.1.5 Probenvorbereitung zur Messung unter dem Dunkelfeldmikroskop

Um wässrige Proben zu vermessen, werden Deckgläser und Objektträger mit einer hydrophoben Oberfläche benötigt. Durch die wasserabweisende Beschichtung können anziehende Wechselwirkungen zwischen dem wässrigen Milieu und dem Glas reduziert werden. Dazu werden die Gläser zunächst mit konzentrierter Schwefelsäure gereinigt und nachfolgend mit Wasser und Ethanol gespült. Nachdem die Gläser getrocknet sind, werden sie unter Schutzgasatmosphäre mit Octadecyltrichlorsilan beidseitig beschichtet und über Nacht getrocknet. Dabei kommt es zu einer Reaktion zwischen den Hydroxylgruppen des Glases und den Trichlorsilangruppen des Silans. Zur Reinigung der Gläser und zum Entfernen angetrockneter Silanreste werden sie abschließend mit n-Hexan abgewaschen.

Mittels Pipette wird jeweils ein Tropfen der zu mikroskopierenden Probe auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas angedrückt, so dass innerhalb der Probe keine

Luftblasen entstehen. Wenn die Probe gleichmäßig verteilt und ohne Lufteinschluss vorliegt, kann sie versiegelt werden. Hierfür wird das Deckglas mit einem definierten Gewicht belastet, um die Schichtdicke der Probe möglichst gering zu halten. Die Ränder des aufliegenden Deckgläschens werden mit flüssigem Paraffin oder Wachs (eines handelsüblichen Teelichts) versiegelt. Um einen optimalen Teilchen-Hintergrund-Kontrast zu erzielen, ist es gegebenenfalls notwendig, die Proben zuvor mit destilliertem Wasser auf die gewünschte Konzentration zu verdünnen.

Während der Messung wird ein mit Wasser gefülltes Becherglas über die Lichtquelle des Dunkelfeldmikroskops gestellt, um die Erwärmung der Probe durch den infraroten Anteil des Lichts zu minimieren. Zur Temperaturkontrolle wird unmittelbar neben der Probe ein Temperaturfühler angebracht. Die Messtemperatur wird in regelmäßigen Abständen protokolliert und anschließend über alle Werte gemittelt. Weiterhin wird die Schichtdicke der Probe an verschiedenen Positionen über die Schärferegulierung von Deckglas und Objektträger bestimmt und ebenfalls über alle Dicken gemittelt.

Angaben über die individuellen Messparameter der untersuchten Dispersionen können den Tabellen 6.1 bis 6.9 im Anhang entnommen werden.

3.5.2 Rasterkraftmikroskopie

3.5.2.1 Die Methode der atomaren Kraftmikroskopie

Bei der Rasterkraft- oder atomaren Kraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy, AFM) handelt es sich um ein spezielles Verfahren aus der Familie der Rastersondenmikroskopie. Sie wird genutzt, um atomare Prozesse der Oberflächenchemie und -physik zu beobachten. Dabei ist es möglich, eine dreidimensionale, graphische Abbildung des Probenmaterials durch mechanische Abtastung seiner Oberfläche und Kraftmessungen auf nanoskopischer Ebene zu erhalten. Hierzu wird eine Messsonde, eine sehr feine Spitze, angebracht am freien Ende einer flexiblen Balken- oder Blattfeder (Cantilever), in geringem Abstand zeilenweise über die Oberfläche einer Probe geführt (siehe Abbildung 3.10a).

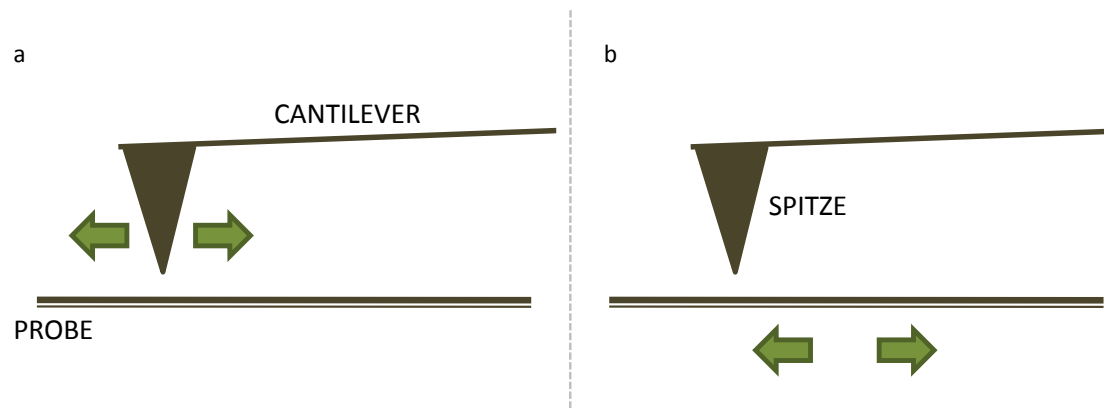


Abbildung 3.10: Zwei Scanmöglichkeiten: a) Die Probe ist fixiert, die Messspitze bewegt sich, b) die Messspitze ist fixiert, die Probe ist mobil.

Bei diesem Vorgang, dem sogenannten Scannen, kommt es in Abhängigkeit von der Oberflächenstruktur zu einer positionsbedingten Auslenkung des Cantilever. Seine Verbiegung wird durch wechselwirkende Kräfte zwischen Spitze und Probe hervorgerufen.¹⁴² Attraktive Wechselwirkungen bewegen den Cantilever zur Probe hin, repulsive Kräfte sorgen für eine Abstoßung von der Oberfläche. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um Van-der-Waals- und Kapillarkräfte, die eine anziehende Wechselbeziehung hervorrufen bzw. kürzerreichende, abstoßende Kräfte als quantenmechanischer Effekt aufgrund der Pauliabstoßung bei der Überlappung von Elektronenorbitalen, wenn die Distanz zwischen Spitze und Probe zu kleine Werte annimmt.^{143, 144} Der Grad der Auslenkung kann über ein Laser-Detektionssystem nach dem Lichtzeigerprinzip hochaufgelöst bestimmt und in ein elektrisches Signal konvertiert werden. Die schematische Anordnung der relevanten Messinstrumente ist der nachstehenden Abbildung (siehe Abbildung 3.11) zu entnehmen.

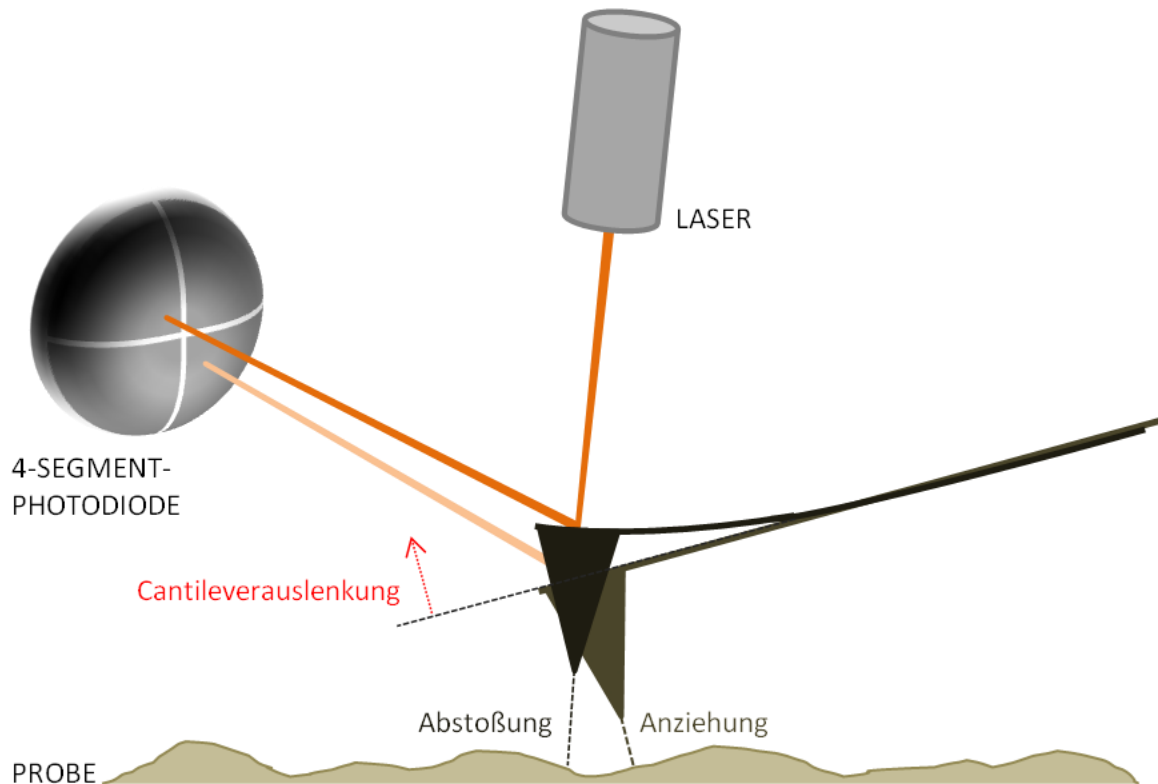


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Messanordnung zur Ausführung einer AFM-Messung (nach [143]).

Dabei wird ein fokussierter Laserstrahl auf die Oberseite des Cantilever gerichtet und die Reflektion durch eine positionssensitive Viersegment-Photodiode aufgefangen, so dass sowohl eine vertikale als auch eine laterale Auslenkung der Blattfeder erfasst werden kann. Die auf diese Weise ermittelten Daten werden dann in entsprechende Farbwerte und damit in eine topografische Abbildung der Oberfläche übertragen.^{143, 145}

3.5.2.2 Betriebsmodi

Die Messung der auf die Spitze wirkenden Kräfte kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Im statischen Modus (Contact-Mode) wird über die Federkonstante des Hebelarms mit Hilfe des Hooke'schen Gesetzes von der Durchbiegung des Cantilever auf die wirkende Kraft geschlossen.¹⁴⁶ Die Spitze steht hierbei in einem stetigen Kontakt mit der Probenoberfläche, im Bereich repulsiver Wechselwirkungen (siehe Abbildung 3.12). Dazu verfährt man entweder im Constant-Force-Mode, indem mit einem konstanten Kraftwert gemessen wird oder im Constant-Height-Mode, indem der Cantilever mit konstanter Höhe über die Probenoberfläche geführt wird. Mit dieser Messtechnik lassen sich jedoch nur sehr flache Proben untersuchen; Unebenheiten bergen die Gefahr destruktiver Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe.¹⁴⁵

Im dynamischen Modus (Non-Contact-Mode und Intermittent-Contact-Mode) wird der Cantilever dagegen als harmonischer Oszillator betrachtet und zu Schwingungen angeregt, wobei das Schwingungsverhalten durch Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe beeinflusst wird.¹⁴⁶ Im Non-Contact-Mode oszilliert der Cantilever nahe der Probenoberfläche, berührt sie jedoch nicht.¹⁴⁵ Im Vergleich zum Contact-Mode befindet man sich hier im Bereich der attraktiven Van-der-Waals-Kräfte (vgl. Abbildung 3.12). Der Balken schwingt innerhalb eines geschlossenen Schwingkreises sehr nahe seiner Resonanzfrequenz. Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe führen zu Änderungen der Schwingungsfrequenz.

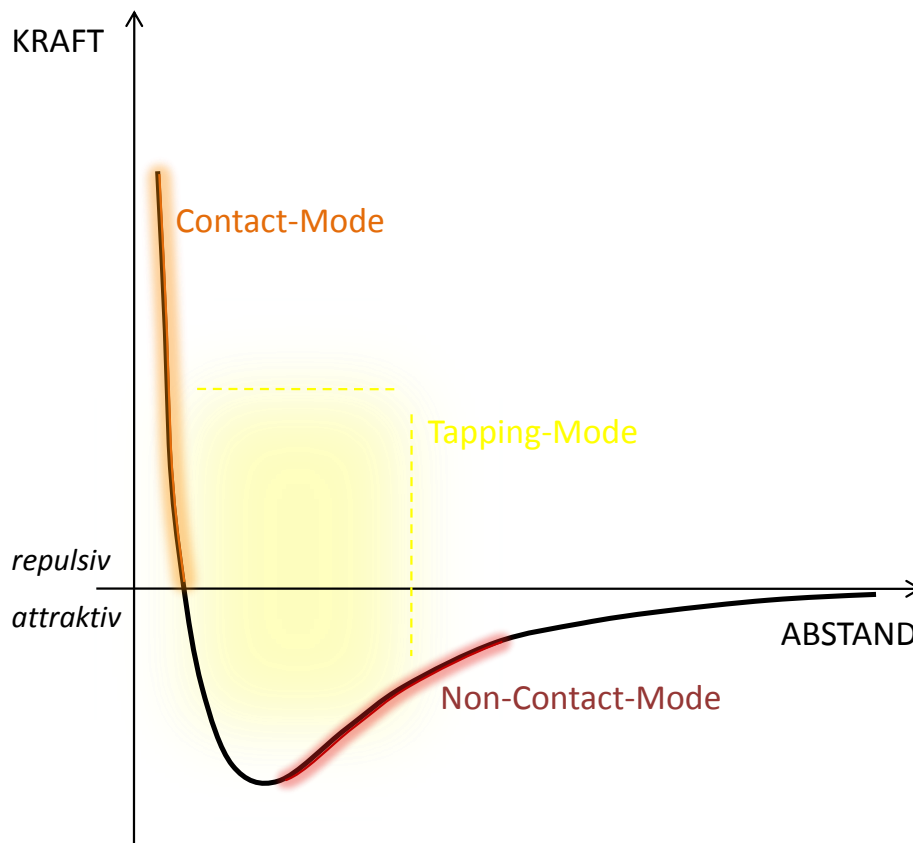


Abbildung 3.12: Lennard-Jones-Potential mit Kennzeichnung der Arbeitsbereiche der AFM-Betriebsmodi (nach [143]).

Für die Untersuchung der Proben dieser Arbeit werden die Messungen im Intermittent-Contact-Mode, auch Tapping-Mode genannt, gefahren. Hierbei kommt es zu einem zyklisch repetierenden Kontakt zwischen Probe und Spitze, wodurch sich die Oszillationsamplitude verringert.¹⁴⁵ Im Gegensatz zum Non-Contact-Mode erfolgt die externe Anregung des Cantilever bei einer festen Frequenz.

3.5.2.3 Cantilever und Spitze

Der Cantilever besteht in der Regel aus Silicium oder Siliciumnitrid mit einer Länge von ungefähr $100\ \mu\text{m}$ und Federkonstanten im Bereich von $0,005\ \text{N/m}$ bis $40\ \text{N/m}$. Seine Rückseite

ist häufig beschichtet, als unterstützende Maßnahme zur Verbesserung der Reflektivität gegenüber dem Laser-Detektionssystem. Um die Handhabung zu erleichtern, ist die Blattfeder an einem Chip angebracht (siehe Abbildung 3.13).^{144, 145} Die passgenaue Bewegung des Cantilever bzw. der Spitze wird über ein Piezostellelement gesteuert.



Abbildung 3.13: Großaufnahme eines Cantilverhalters (Chip) mit markierten Cantilever (aus [145]).

Die Messspitze kann eine Länge von einigen Mikrometern aufweisen, mit einem Spitzenradius von 5 bis 15 nm.^{143, 145} Für eine gute Auflösung sowie zur Vermeidung von Artefakten sollte die Spitze ein gleichmäßig abgerundetes Spitzenende mit einem kleinen Öffnungswinkel besitzen und nicht intrinsisch verbiegbare sein. Als Spitzenmaterial werden daher oft harte Werkstoffe, wie Diamant oder Siliciumverbindungen, verwendet.¹⁴⁷ Bei den Spitzengeometrien unterscheidet man zum Beispiel zwischen konisch, pyramidal und polygon pyramidal (siehe Abbildung 3.14). Letztere entspricht der in dieser Arbeit eingesetzten Spitzenform.

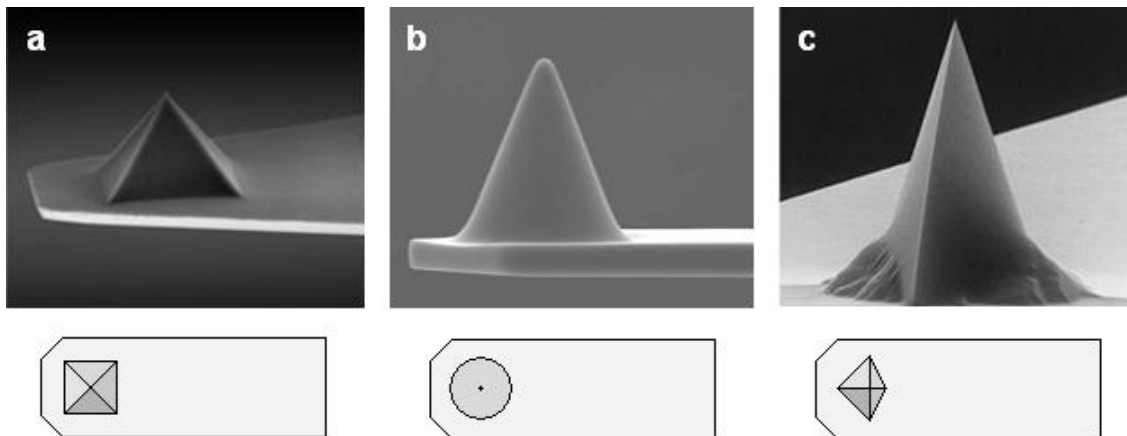


Abbildung 3.14: Mögliche AFM-Spitzengeometrien, a) pyramidal, b) konisch, c) polygon pyramidal (aus [145]).

3.5.2.4 Kraftspektroskopie

Die topographische Abbildung des Probenmaterials ist nur eine von vielen Informationen, die der Messung der Spitzen-Proben-Wechselbeziehung entnommen werden kann. So können mit Hilfe der Kraftspektroskopie auch Einblicke in die mechanische Stabilität und die elastischen Eigenschaften der Proben gewonnen werden. Dazu wird der Cantilever in vertikaler Richtung auf die Probe herabgesenkt, mit definierter Kraft auf die Oberfläche gedrückt und wieder von dieser entfernt. Über die daraus resultierende Auslenkung des Cantilevers kön-

nen dann Rückschlüsse auf die existierenden Wechselwirkungskräfte und damit in gewisser Weise über die Beschaffenheit der Probe und im hiesigen Fall sogar über die Kapselstruktur gezogen werden.

Wird die Spitze auf eine harte, inkompressible Oberfläche (z.B. Glas oder Mica) „gedrückt“, erhält man für die Auftragung der Cantileverauslenkung gegen den Abstand folgenden Verlauf:

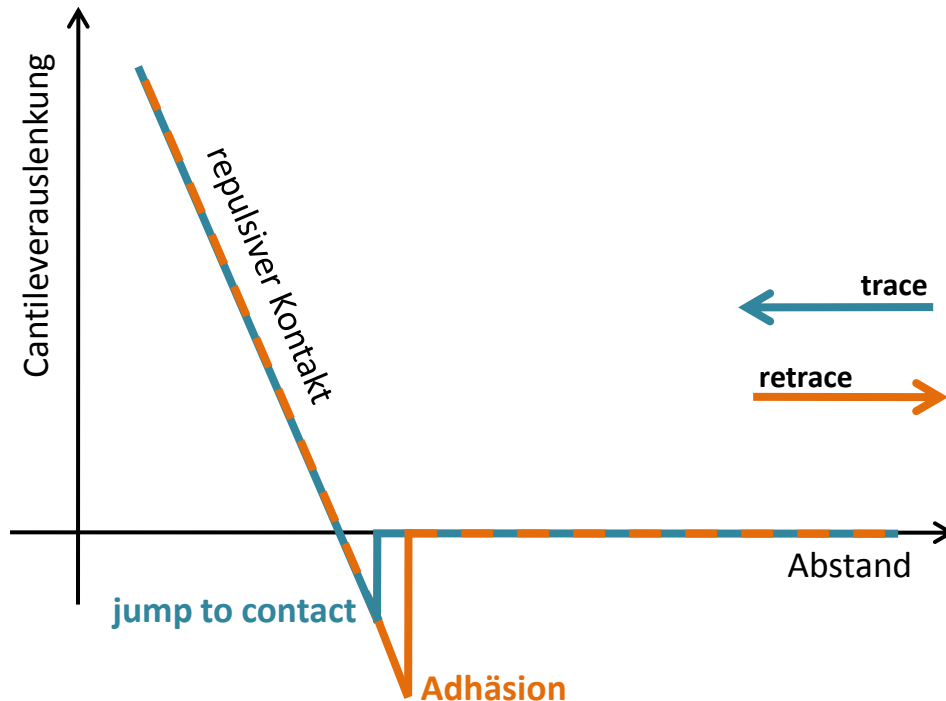


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Kraft-Abstands-Kurve bei Annäherung (blau) und Entfernung (orange) der Messspitze während einer kraftspektroskopischen Messung an einer harten, inkompressiblen Oberfläche (nach [143]).

Die blaue Kurve beschreibt den Annäherungsprozess, also die Spitzenbewegung in Richtung Probenoberfläche (trace-Kurve). Die orange Kurve repräsentiert hingegen das Zurückziehen der Spitze von der Probe (retrace-Kurve). Wird die Spitze auf die Oberfläche herabgesenkt, verbleibt der Cantilever zunächst in seiner Ruhelage (Nulllinie), bis der Abstand einen Wert erreicht, an dem die attraktiven Kräfte stark genug sind, um die Spitze in direkten Kontakt auf die Oberfläche zu ziehen (jump to contact). Eine weitere Annäherung sorgt für eine stetige Verringerung des Abstands zwischen der Cantileverbasis und der Probe, wodurch es zu einer Verbiegung der Blattfeder und einem proportionalen Anstieg der repulsiven Kontaktkraft kommt. Auf dem Rückweg (Entfernen) haftet die Spitze solange an der Probenoberfläche, bis die Cantileverkraft gegenüber den adhäsiven Kräften überwiegt. Erst dann kann sich die Spitze von der Oberfläche lösen und der Cantilever in seine Ruhelage zurückkehren.¹⁴³ In Abbildung 3.16 sind die Abfolge der vertikalen Spitzenbewegung sowie die dabei auftreten-

den Änderungen in der Auslenkung des Cantilever für den Hin- und Rückweg zusammengefasst.

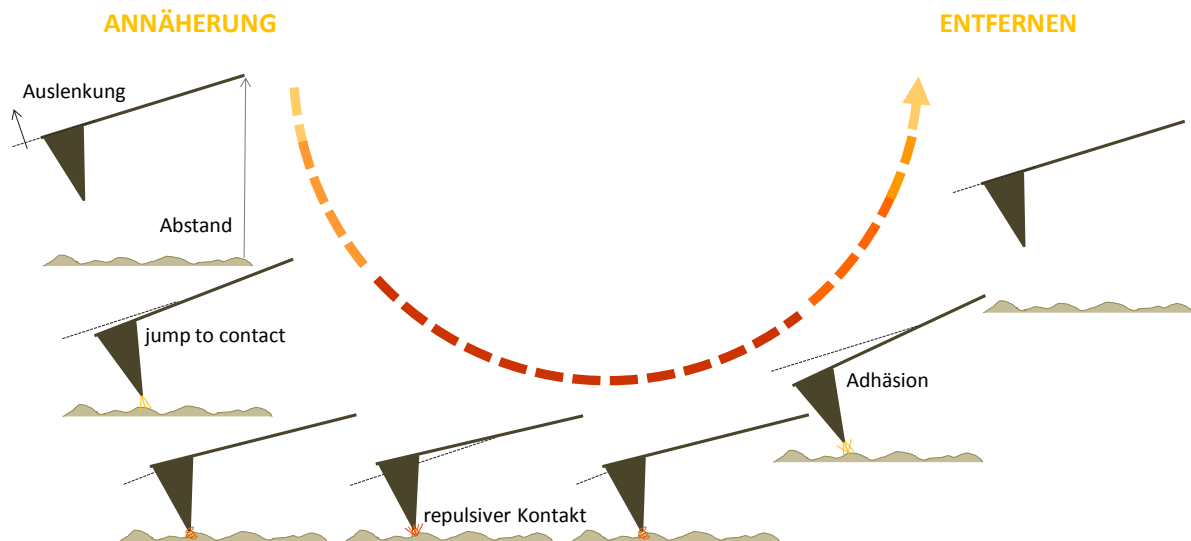


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der vertikalen Spitzenbewegung während der Annäherung und der Entfernung des Cantilevers bei einem kraftspektroskopischen Experiment (nach [143]).

Bei den zu untersuchenden Nanokapseln sollte es sich jedoch um weichere bzw. kompressible Proben handeln. Unter diesen Umständen (Normalfall) ergeben sich Abweichungen von dem oben beschriebenen Verhalten (Idealfall). Der entsprechende Verlauf der trace- und retrace-Kurven ist stellvertretend in Abbildung 3.17 dargestellt. Nachdem die Annäherung der Spitze in Richtung Probenoberfläche zunächst analog zum Experiment an einer harten Oberfläche erfolgt, sind im Bereich des repulsiven Kontakts deutliche Unterschiede zu erkennen. Entgegen des zuvor linearen Anstiegs beobachtet man in diesem Fall erst eine leichte Abflachung und anschließend einen etwas steileren Verlauf der Kurve. Dies lässt sich beispielsweise durch eine Verhärtung des Probenmaterials während des Kompressionsvorgangs (elasto-plastische Probe) oder bei einer sehr dünnen Probenoberfläche durch das Auftreffen der Spitze auf das harte Trägermaterial erklären. Dadurch kann beim Rückzug der Spitze eine Hysterese entstehen aus der sich die an der Probe verrichtete Arbeit berechnen lässt.^{143, 145}

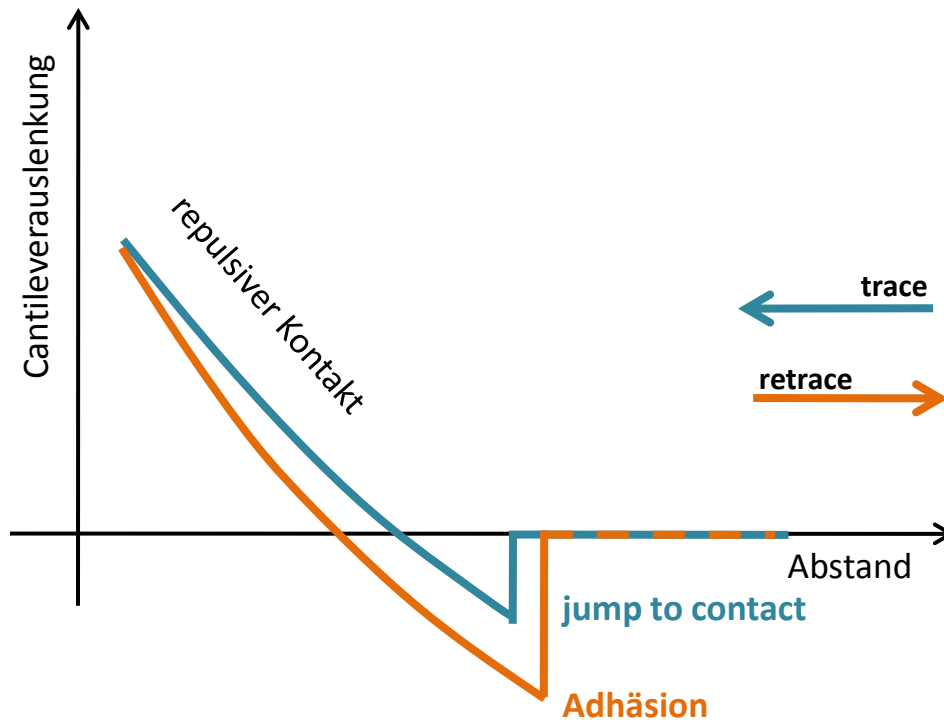


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Kraft-Abstands-Kurven für den Hin- und Rückweg bei einer kompressiblen Probe (Normalfall).

Um die gewünschten Informationen aus den Kraft-Abstands-Kurven zu erhalten, müssen die aus den Experimenten ermittelten Daten, die aufgrund der vorgegebenen Messanordnung in Form von elektrischen Signalen ausgegeben werden, in ein korrespondierendes Format konvertiert werden. Dies soll beispielhaft anhand der Untersuchung an einer harten Oberfläche erläutert werden.

Zunächst muss die Auslenkung des Cantilever, die vom Gerät als Spannungssignal detektiert wird und sich proportional zur auftretenden Kraft zwischen Spitze und Probe verhält, kalibriert werden. Hierzu lässt sich aus dem linearen Verlauf des Kontaktregimes die Strecke berechnen, die der Cantilever für eine genau definierte Änderung des Photodetektorsignals zurücklegt (siehe Abbildung 3.18 links). Daraus ergibt sich als Proportionalitätsfaktor die Sensibilität, die eine Überführung der Spannungswerte für die Cantileverauslenkung in der Einheit Volt in ein metrisches System (Einheit: Nanometer) ermöglicht (siehe Abbildung 3.18 rechts). Zudem ist eine Korrektur der Höhe für die Auslenkung des Cantilever notwendig, welche bisher aus der Position des Piezoelements übernommen wurde. Seine Lage entspricht aber nicht in jedem Fall der wahren Höhe des Cantilevers und wird daher durch stetige Subtraktion der Auslenkung von der Piezohöhe neu kalibriert.^{143, 145}

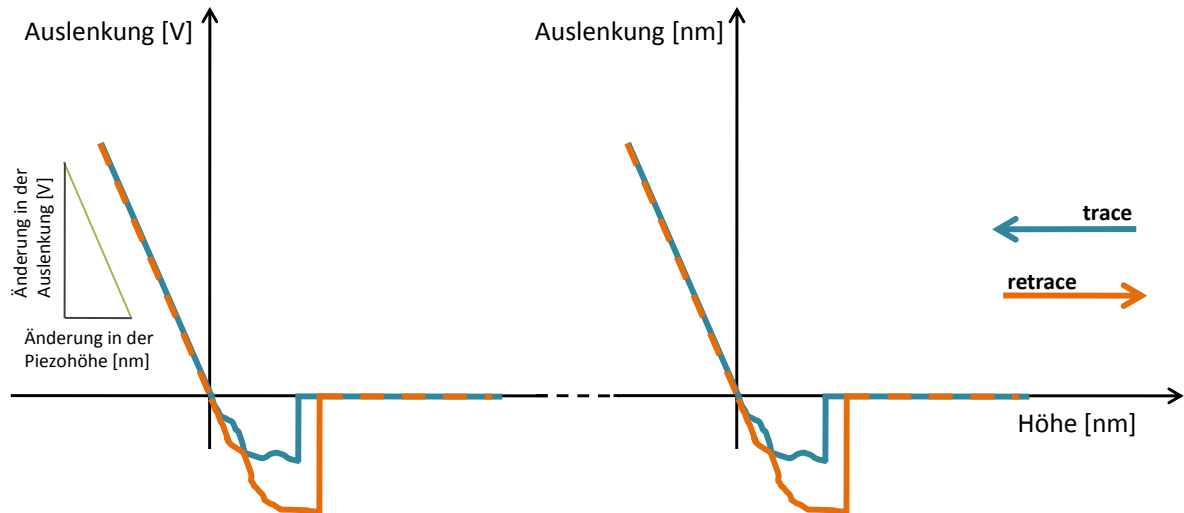


Abbildung 3.18: Auslenkungs-Abstands-Diagramm eines kraftmikroskopischen Experiments auf einer harten Oberfläche; links: unbearbeitet, rechts: nachdem die Auslenkung von Volt in Nanometer konvertiert wurde (nach [143]).

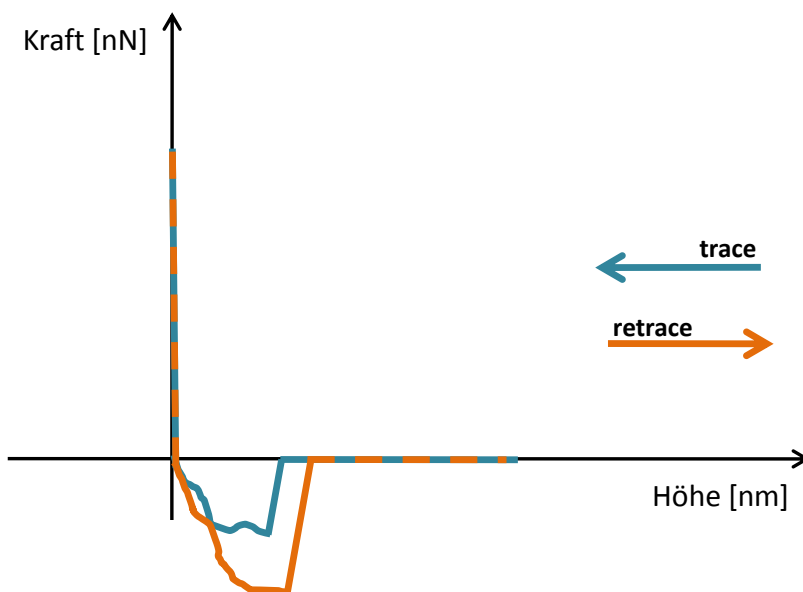


Abbildung 3.19: Auslenkungs-Abstands-Diagramm eines kraftmikroskopischen Experiments auf einer harten Oberfläche nach dem Konvertieren der Auslenkung in eine Kraft (nach [143]).

3.5.2.5 Probenvorbereitung zur Messung mittels Rasterkraftmikroskopie

Die Proben werden zur Aufnahme der topographischen Abbildungen und für die spektroskopischen Kompressionstests gleichermaßen vorbereitet. In der Regel werden beide Prozesse an der gleichen Probe in aufeinander folgenden Schritten durchgeführt, d.h. die Partikel werden abgebildet, eingedrückt und erneut abgebildet. Um einzelne Partikel bzw. Kapseln gezielt detektieren zu können, ist es vorteilhaft, dass der aufgetragene Probenfilm eine geringe

Schichtdicke (Filmhöhe) und eine „saubere“ Oberfläche aufweist. Dazu werden die Dispersionen mit destilliertem Wasser verdünnt. Als Substrat werden mit Ethanol gereinigte Objektträger verwendet, auf die mittels Pipette gleichmäßig mehrere Tropfen einer verdünnten Probe aufgebracht werden. Die eingetrocknete Schicht wird mit einer geringen Menge abs. Ethanol abgewaschen, um die für die Messungen hinderlichen Tensid- und sonstige störende Ablagerungen zu reduzieren.

Die Messungen erfolgen mit dem Rasterkraftmikroskop „NanoWizard“ der Firma JPK Instruments und werden im Intermittent-Contact-Mode durchgeführt. Die Festlegung der Scanrate wird in Abhängigkeit von der Probe sowie der Bildgröße bestimmt und beträgt 0,5 bzw. 1 Hz. Als Cantilever werden Non-Contact-/Tapping-Mode-Cantilever des Typs „NanoWorld Pointprobe NCH“ der Firma NanoWorld eingesetzt. Angaben über die entsprechenden technischen Daten sind in Tabelle 6.14 im Anhang aufgeführt. Die Messspitzen haben eine Höhe von 10 bis 15 μm mit einem typischen Spitzenradius unterhalb von 8 nm.

3.5.3 Kernresonanzspektroskopie

3.5.3.1 Die Methode der Kernmagnetischen Resonanz

Bei der Kernmagnetischen Resonanz, NMR (nuclear magnetic resonance, Kernresonanzspektroskopie, Hochfrequenzspektroskopie), handelt es sich um eine Messmethodik, die den Einfluß von radiofrequenter Strahlung auf bestimmte Atomkerne in einem externen homogenen Magnetfeld ausnutzt, um Moleküle bzw. Materialien zu charakterisieren. Hierbei können sowohl die elektronische Umgebung einzelner Atome als auch ihre Wechselwirkungen mit benachbarten Atomen untersucht werden, um beispielsweise Aufschluß über strukturelle und/oder dynamische Gegebenheiten von Molekülen zu erlangen oder auch innerhalb eines Nachweisverfahrens Konzentrationsbestimmungen durchzuführen. Im Grunde werden dazu, ähnlich anderen spektroskopischen Methoden, Quantenübergänge zwischen energetisch differenten Zuständen induziert und Energieunterschiede gemessen. Hierfür eignen sich Atomkerne, die einen von Null verschiedenen Kernspin I besitzen, also eine insgesamt ungerade Anzahl von Protonen und Neutronen aufweisen. Daraus ergeben sich zwei Kombinationsmöglichkeiten: ungerade – gerade (ug) bzw. gerade – ungerade (gu), führt zu einem halbzahligen Spin; ungerade – ungerade (uu), führt zu einem ganzzahligen Spin. Liegt eine gerade Anzahl von Nukleonen vor, so ist der Kernspin gleich null.¹⁴⁸

Mit dem Kernspin ist ein magnetisches Moment μ gekoppelt, welches mit einem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung treten kann. Der mathematisch-physikalische Zusammenhang zeigt sich in Gleichung 17:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \hbar \cdot \vec{I} \quad (17)$$

mit γ als das gyromagnetische Verhältnis. Wie I unterliegt auch μ einer Richtungsquantelung und folgt der Kernspin-Multiplizität $(2I + 1)$. Sie gibt die verschiedenen Orientierungsmöglichkeiten an, die der Spinvektor bezüglich einer ausgezeichneten Achse einnehmen kann. Die jeweilige Orientierung wird durch die magnetische Kernspinquantenzahl m_I beschrieben, welche einen Wert von $-I$ bis I einnehmen kann (mit $\Delta m_I = \pm 1$). In Gegenwart eines externen Magnetfeldes wird die Entartung der Spinzustände aufgehoben. Ihre energetisch bedingte Aufspaltung wird als Zeemann-Aufspaltung bezeichnet. Die potenzielle Energie E ergibt sich dabei aus

$$E = -\mu_z \cdot B_0 = -\gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \cdot m_I \quad (18)$$

mit μ_z als magnetisches Moment des Kerns bezüglich der Vorzugsrichtung z des Magnetfeldes B_0 . Im thermischen Gleichgewicht werden die Zeemann-Niveaus entsprechend der Boltzmann-Verteilung besetzt, wobei N_α die Zahl der Kerne im energieärmeren und N_β die Zahl der Kerne im energiereicheren Niveau bedeuten. Für einen Spin-1/2-Kern gilt damit:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{(\Delta E/k_B T)} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad (19)$$

ΔE kennzeichnet den Energieunterschied zwischen den Zuständen, k_B ist die Boltzmannkonstante und T die Temperatur. Durch das externe Magnetfeld vollzieht der Kernspin eine Präzessionsbewegung mit einer spezifischen Frequenz um die Richtung von B_0 . Sie wird Larmorfrequenz ω_0 genannt.

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (20)$$

Durch Einstrahlung von Radiofrequenzimpulsen kann das thermische Gleichgewicht des Spinsystems im Magnetfeld als Folge spinerlaubter Übergänge zwischen den Energieniveaus gestört werden. Die erforderliche Resonanzfrequenz entspricht der Larmorfrequenz und geht aus der Beziehung

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 = \hbar \cdot \omega_0 = h \cdot \nu_0 \quad (21)$$

hervor, wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum ist. Nach Beenden eines Pulses streben die Spins die Rückkehr in den thermischen Gleichgewichtszustand an. Dieser Vorgang wird

als Relaxation bezeichnet. Unmittelbar nach der Störung ist man nun in der Lage Informationen über das System abzugreifen.^{148, 149} Dies geschieht in dieser Arbeit mittels zweier NMR-technischer Messverfahren.

3.5.3.2 Aufnahme eines NMR-Spektrums – Chemische Verschiebung

Um die Kernspins aus ihrer thermodynamischen Gleichgewichtslage zu bringen, wird das System mit einem 90° -Puls ($\equiv B_1$ im rotierenden Koordinatensystem mit der Winkelgeschwindigkeit ω_r) angeregt. Dadurch verlagert sich die Spinorientierung als rotierendes Magnetfeld M_0 in die xy-Ebene des betrachteten Koordinatensystems und kann als sinusförmiges Wechselfeld, in dem die verschiedenen Larmorfrequenzen enthalten sind, entlang der x- oder y-Achse gemessen werden (siehe Abbildung 3.20). Die unterschiedlichen Resonanzfrequenzen sind nicht allein eine Folge des Einflusses des externen Magnetfeldes, sondern können auch auf eine unterschiedliche chemische Umgebung der Atome innerhalb der Moleküle zurückgeführt werden. Dies wird, hinsichtlich der spektroskopischen Anwendung der NMR, unter dem Begriff der chemischen Verschiebung als charakterisierender Parameter zum Zweck der Strukturaufklärung verwendet.

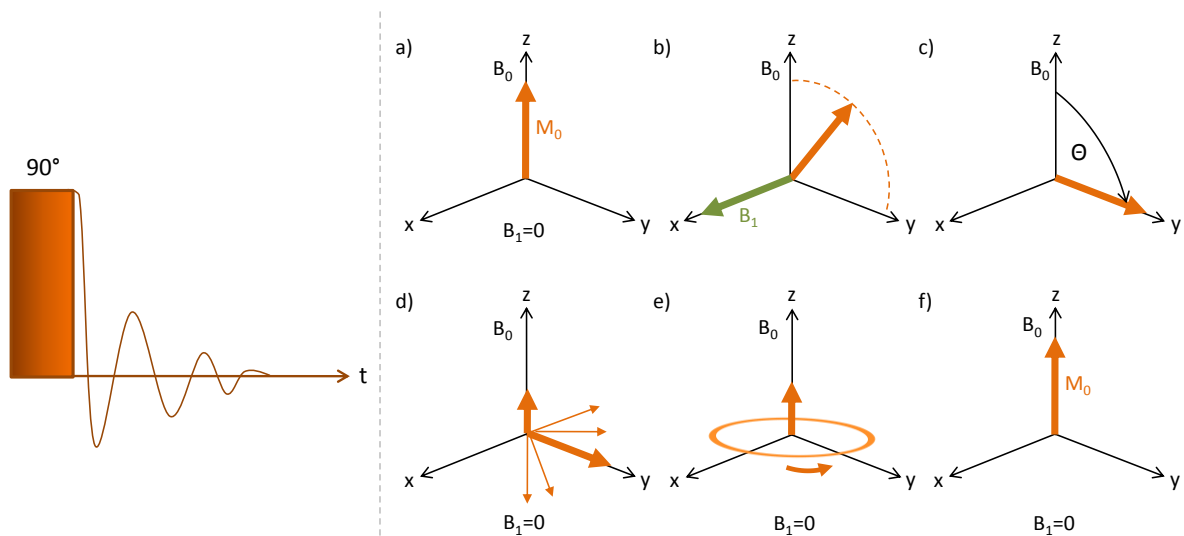


Abbildung 3.20: links: Einpulssequenz zur Auslenkung der Spinmagnetisierung \vec{M}_0 aus der Gleichgewichtslage (nach [148]); rechts: Vektordarstellung der Spinmagnetisierung während eines 90° -Impuls-experiments (nach [149]).

Die abklingende Oszillation des durch die Spins erzeugten magnetischen Wechselfeldes wird als so genannter FID (free induction decay) aufgezeichnet und die Frequenzbestandteile über Fouriertransformation mit entsprechenden Peaks zu jeder auftretenden Larmorfrequenz auf der x-Achse in ein NMR-Spektrum übertragen (vgl. Abbildung 3.21).¹⁵⁰ Hierbei wird die Frequenzverschiebung in der Regel in Relation zu einer Referenzsubstanz aufgetragen.

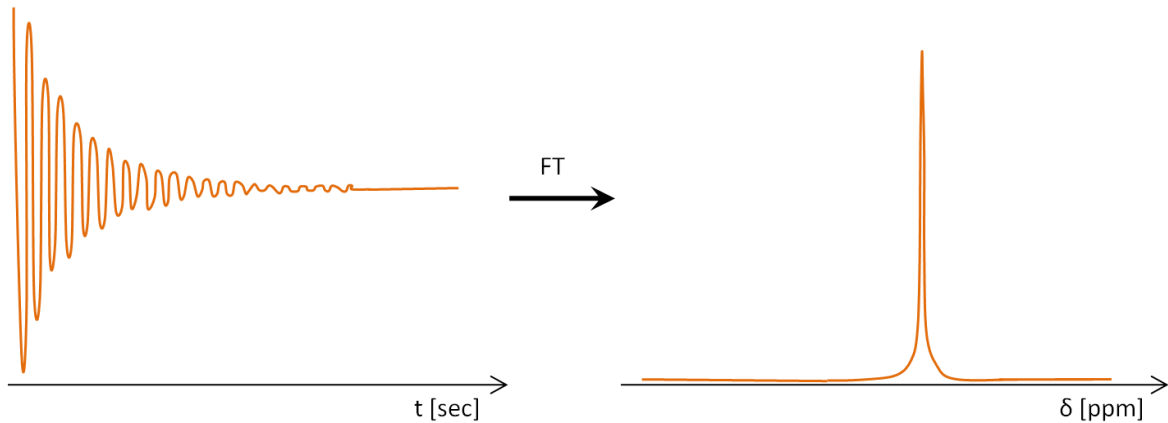


Abbildung 3.21: links: FID-Signal beispielhaft bei nur einer Larmorfrequenz; rechts: fouriertransformiertes FID-Signal (nach [149]).

3.5.3.3 Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

Um nach der Störung in den Gleichgewichtszustand zurückzugelangen, treten die Spins in Wechselwirkung mit ihrer Umgebung, dem sogenannten Gitter, wobei es zu einem Energieaustausch zwischen dem Spinsystem und den umgebenden Kernen anderer Atome oder Moleküle kommt. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Vorgang abläuft, wird entsprechend als Spin-Gitter-Relaxationszeit oder auch longitudinale Relaxationszeit T_1 bezeichnet. Durch Messen von T_1 sind Rückschlüsse auf das dynamische Verhalten der Probe möglich. Im hiesigen Experiment wird dazu die Inversion-Recovery-Sequenz, bestehend aus einem 180° -Puls gefolgt von einem 90° -Puls, eingesetzt (siehe Abbildung 3.22).

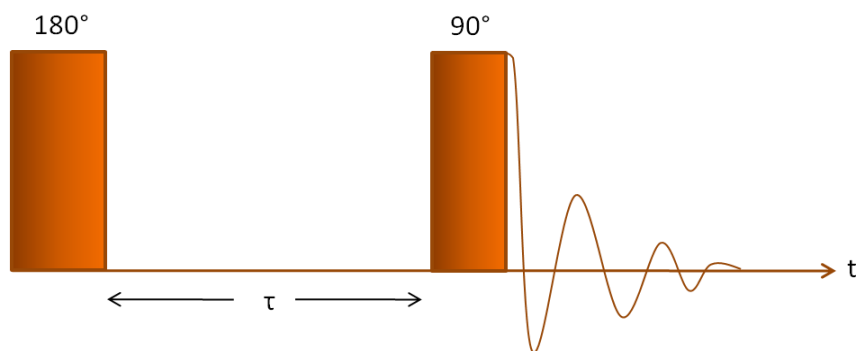


Abbildung 3.22: Pulssequenz zur Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 (nach [148]).

Mittels des ersten Pulses wird die Ausrichtung des Spinsystems, ihre Magnetisierung, um 180° entlang des externen B_0 -Feldes gedreht und wird damit zu $-M_0$. Die Bestimmung der Relaxationszeit erfolgt nun, indem zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem 180° -Impuls die aktuelle Magnetisierung der Spins ermittelt wird, welche durch einen 90° -Puls in eine detektierbare Quermagnetisierung in der xy-Ebene gedreht wird (siehe Abbildung 3.23).¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

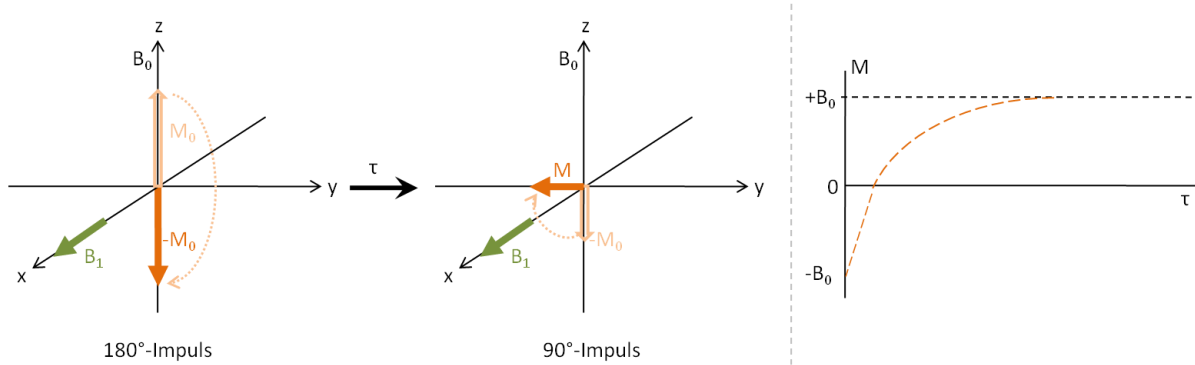


Abbildung 3.23: links: Inversion-Recovery-Sequenz; rechts: zeitlicher Verlauf der Magnetisierung (nach [149]).

3.5.3.4 Übertragung der NMR-Technik auf die Untersuchung von PFD-gefüllten Nanokapseln – ^{19}F -NMR

Um Aussagen über die Sauerstoffaufnahme- und abgabekapazität der synthetisierten perfluordecalingefüllten Nanokapseln treffen zu können, werden spektroskopische Messungen (Absorptionsspektren) und T_1 -Bestimmungen durchgeführt. Das zugeführte Gas verändert die chemische Umgebung des Perfluordecalin, so dass sich daraus ein Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffgehalt in Perfluordecalin und der Signalverschiebung sowie der Spin-Gitter-Relaxationszeit herleiten lässt. Zur Überprüfung der Korrelationen wird eine Kalibrierkurve von reinem, begastem Perfluordecalin erstellt und mit analogen Messungen an perfluordecalingefüllten Kapseldispersionen verglichen. Zudem können anhand von Gas-austauschexperimenten durch Auftragung der Signalverschiebung bzw. des Sauerstoffanteils gegen die Zeit Sauerstoffsättigungsdiagramme angefertigt werden.

^{19}F -spektroskopische Messungen an reinem Perfluordecalin

Die ^{19}F -Messungen erfolgen an einem DRX500 Spektrometer der Firma Bruker. Als Messkopf wird ein 5 mm BB-HR-Messkopf mit auf ^{19}F -getunter ^1H -Entkopplerspule eingesetzt. Zur Auswertung der Daten wird die Software TOPSPIN der Firma Bruker herangezogen.

Kalibrierung mit reinem, begastem Perfluordecalin

Um eine Kalibrierkurve für die Sauerstoffsättigung von reinem Perfluordecalin zu erstellen, werden die Abhängigkeiten der Signalverschiebung sowie der T_1 -Relaxationszeit von der Sauerstoffkonzentration ermittelt. Hierfür werden Proben mit unterschiedlichen Sauerstoffgehalten angefertigt und vermessen.

Kalibrierung durch ^{19}F -Messungen – Abhängigkeit der Signalverschiebung von der Sauerstoffkonzentration

Wie zuvor werden die ^{19}F -Messungen an einem DRX500 Spektrometer der Firma Bruker mit einem 5 mm BB-HR-Messkopf mit auf ^{19}F -getunter ^1H -Entkopplerspule durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels TOPSPIN.

Zur Begasung des Probenmaterials werden Stickstoff/Sauerstoff-Gasgemische mit unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration in einem Vorratsgefäß vorbereitet und dem reinen Perfluordecalin über eine Kapillare zugeführt (siehe Abbildung 3.24). Die genauen Gaskonzentrationen können der Tabelle 4.10 in Kapitel 4.4 entnommen werden.

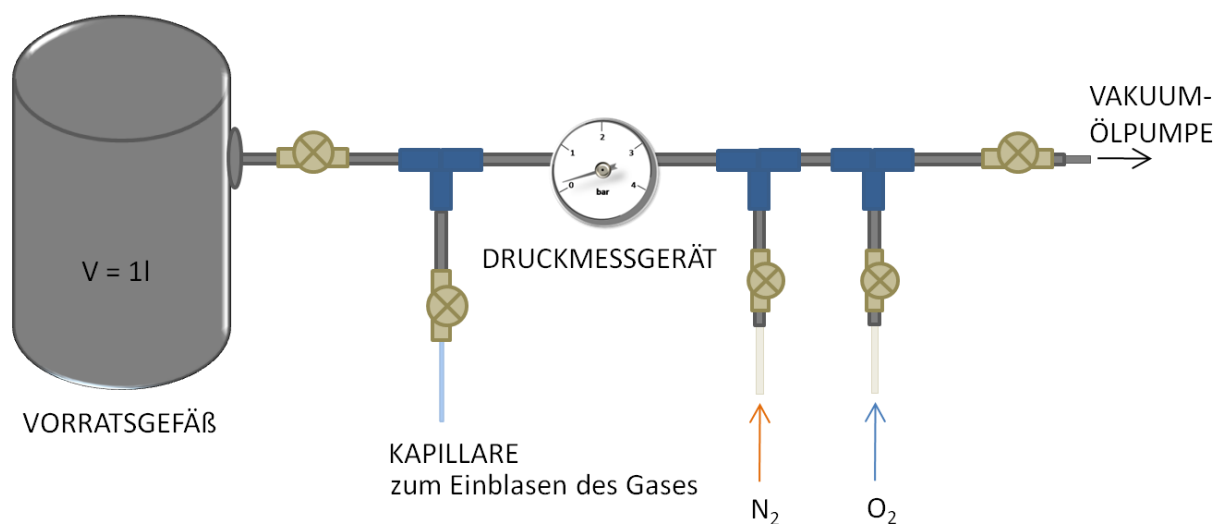


Abbildung 3.24: Schematische Darstellung der Gasabfüllapparatur zur Präparation der begasten Proben.

Die verwendeten NMR-Röhrchen aus Borosilikatglas haben einen Außendurchmesser von 5 mm. Die Füllhöhe an Perfluordecalin beträgt ca. 40 mm. Als externen Lock wird ein mit Aceton- d_6 / TMS gefülltes 1,6 mm Schmelzpunktröhrchen abgeschmolzen und in das NMR-Probenröhrchen gegeben. Nach der Begasung wird das NMR-Röhrchen ca. 20 mm unterhalb der Öffnung abgeschmolzen.

Kalibrierung durch T_1 -Messungen – Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit von der Sauerstoffkonzentration

Die Messungen der T_1 -Relaxationszeiten werden ebenfalls am DRX500 Spektrometer durchgeführt. Als Messkopf dient wiederum ein 5 mm BB-HR-Messkopf mit auf ^{19}F -getunter ^1H -Entkopplerspule. Zur Datenauswertung wird TOPSPIN genutzt.

Als Bezugspunkt wird das Signal von *trans*-Perfluordecalin (*cis/trans*-Gemisch) bei -191,39 ppm genutzt, welches unter Lock auf die externe Aceton- d_6 -Kapillare on resonant mit einem 90° -Puls von 15,4 μs /2 dB vermessen wird. Die Bestimmung des 90° -Pulses wird für jede Probe individuell bestimmt und jede Probe mit Hilfe des Locksignals geshimmt. Die Referenzierung der ^{19}F -Verschiebung wird über eine Messung der ^1H -Verschiebung von TMS in der Aceton- d_6 -Kapillare durchgeführt und über Resonanzfrequenzen nach IUPAC-Empfehlung berechnet. Die T_1 -Relaxationszeit wird mittels der Inversion Recovery Methode mit 24 bis 27 Inkrementen gemessen. Die einzelnen Angaben über die experimentellen Parameter können der Tabelle 4.10 in Kapitel 4.4 entnommen werden.

Gasaustauschexperimente – Erstellen von Sauerstoffsättigungsdiagrammen

Zur Untersuchung der Gassättigung an reinem Perfluordecalin werden schlichte ^{19}F -Messungen, wie oben beschrieben, durchgeführt und die chemische Verschiebung in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt verfolgt. Dazu werden abwechselnd Stickstoff und Sauerstoff über je eine Kapillare in die Probe eingeleitet. Das Umschalten von einem Gas auf das andere geschieht durch Schließen des einen Zuleitungsventils, Druckentlastung der genutzten Zuleitung und Öffnen der jeweils anderen Zuleitung. Der präparative Aufbau ist schematisch in Abbildung 4.25 dargestellt. Die Datenanalyse erfolgt mittels TOPSPIN.

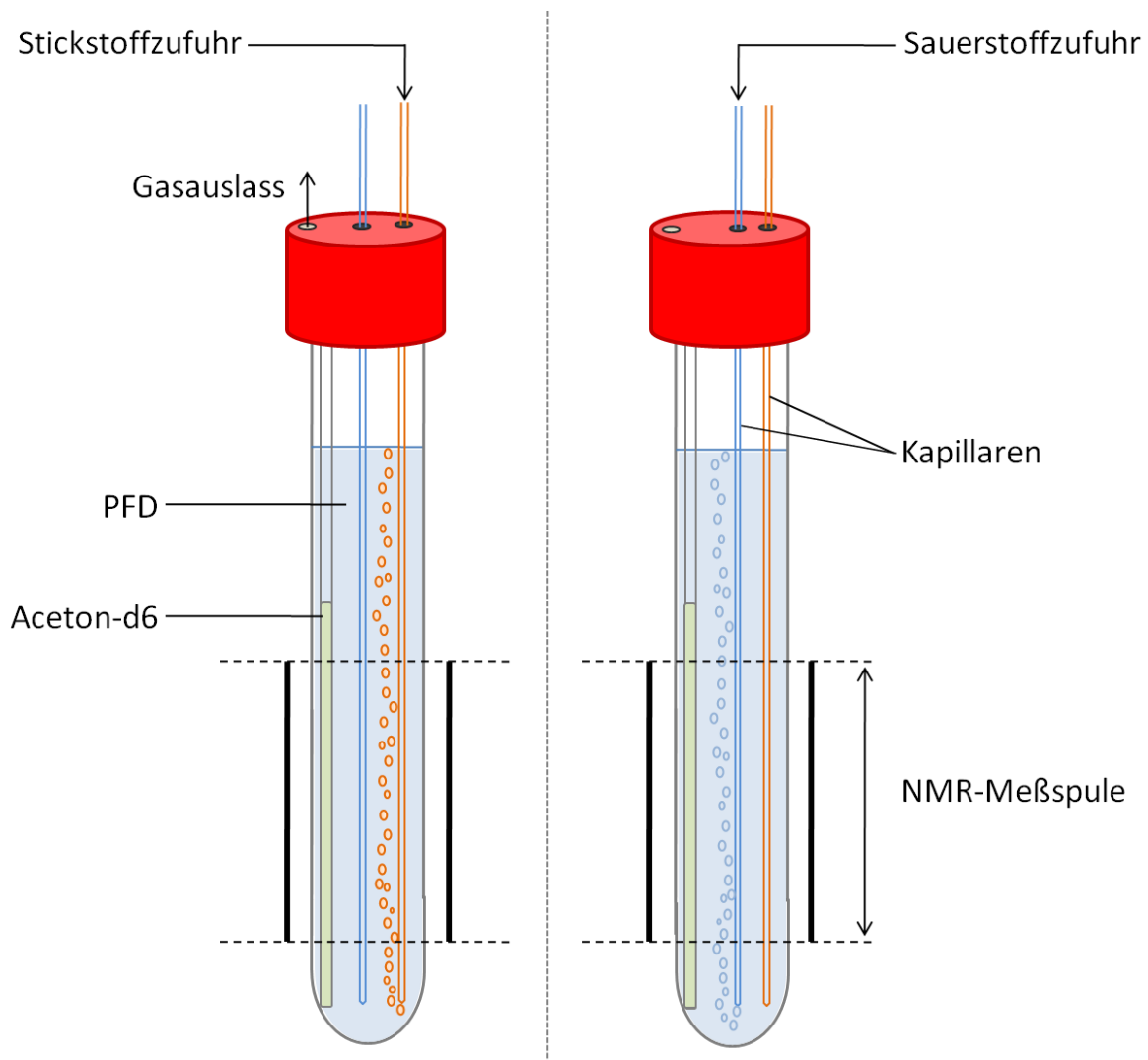


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der Zuleitung von Stickstoff und Sauerstoff mittels 2-Kapillarentechnik für das Gasaustauschexperiment.

NMR-Experimente an Kapselproben

Die kernresonanzspektroskopischen Messungen der Kapseldispersionen verlaufen analog zu den Messungen an reinem Perfluordecalin. Das heißt, es werden ebenfalls die Abhängigkeiten der Signalverschiebung und der Spin-Gitter-Relaxationszeit vom Sauerstoffgehalt untersucht und Gasaustauschexperimente vorgenommen. Die Bestimmung der Signalverschiebung sowie die T1-Messungen erfolgen an Dispersionen perfluordecalingefüllter PLGA-Nanokapseln der Synthese $\text{nk(LV)}_{\text{PLGA/PFD}}$ aus Kapitel 3.3.2. Für das Gasaustauschexperiment werden Kapselproben verwendet, die nach der optimierten Synthesestrategie $\text{nk(O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}}\text{)}_{\text{PBCA/PFD}}$ (siehe Kapitel 3.4.1) hergestellt wurden. Die praktische Durchführung der einzelnen NMR-Messungen entspricht prinzipiell der jeweiligen Beschreibung zur Untersuchung von reinem, begasten Perfluordecalin. Aufgrund des wässrigen Systems kann ein interner Lock verwendet werden. Dazu werden die Proben mit ca. 10 Prozent D_2O angereichert. Im Gegensatz zum Experiment an reinem Perfluordecalin wird die chemische Ver-

schiebung der Fluorsignale durch Akkumulation von drei ^{19}F -Spektren erhalten, um eine gute Signalintensität zu erreichen (vgl. Abbildung 3.26).

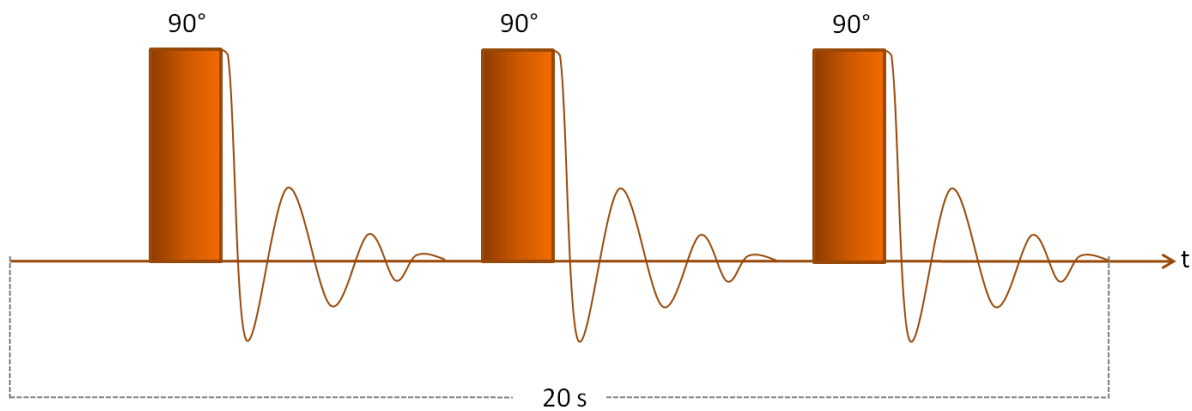


Abbildung 3.26: Pulsfolge zur Akkumulation von drei ^{19}F -Spektren.

3.5.4 Leberperfusion

Unter den hiesigen Leberperfusionsexperimenten ist die künstliche Durchströmung der Blutgefäße einer isolierten Rattenleber mit einer Dispersion aus perfluordecalingefüllten PBCA-Nanokapseln in einem extrakorporalen Kreislauf zu verstehen. Dabei sollen parallele Messungen der Elektrolytkonzentration und Enzymfreisetzung Aufschluss über die Biokompatibilität der Dispersionen bzw. den Grad der Schädigung der Leber geben. Ebenso sollen nachfolgende Particle Tracking-- und NMR-Untersuchungen zeitlich gestaffelt entnommener Proben über eine mögliche Wechselbeziehung zwischen der Leber und den Partikeln unterrichten. Für die Perfusionsexperimente werden vier Kapseldispersionen nach der optimierten Synthesevorschrift für perfluordecalingefüllte PBCA-Nanokapseln mittels der Ouzo-Technik (Optimierung 1, $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}}$) mit einem Tensidgehalt von 20% und einem Monomeranteil von 10% hergestellt (vgl. Kapitel 3.4.1). Die Ansätze werden jeweils mit der dreifachen Menge an Edukten gefahren, so dass das Volumen an Perfluordecalin pro Dispersion $600\ \mu\text{l}$ beträgt. Damit werden vier Perfusionstests durchgeführt. Der schematische Ablauf des Perfusionsexperiments ist der nachstehenden Abbildung 3.27 zu entnehmen.

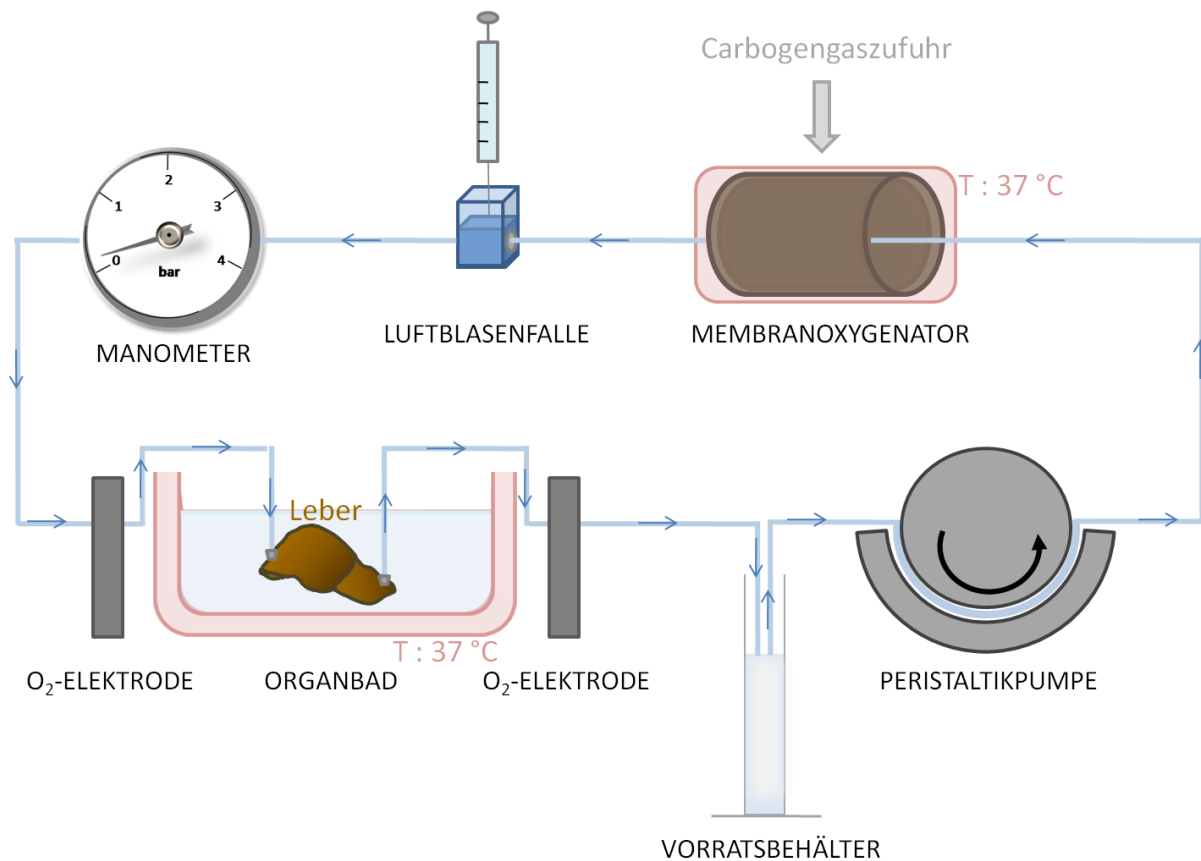


Abbildung 3.27: Schematischer Aufbau zur experimentellen Perfusion einer Rattenleber in einem extrakorporalen Kreislauf.

Die Dispersion wird im Vorratsbehälter (Standzylinder) zunächst mit Krebs-Henseleit-Puffer auf ein Perfusionsvolumen von 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert überprüft, bevor das Medium über eine peristaltische Pumpe mit einem Perfusionszeitvolumen von 1,4 ml/1 g Leber/1 min durch einen Membranoxygenator geleitet wird. Dort wird das Perfusionsmittel mit befeuchtem Carbogengas, einem Gasgemisch aus 95 Volumenteilen Sauerstoff und 5 Volumenteilen Kohlenstoffdioxid, äquilibriert. Der Oxygenator wird dazu mittels einer Heizplatte auf 37°C erwärmt. In Anschluss daran durchläuft die Kapseldispersion eine Blasenfalle, um eine mögliche Gasblasenentwicklung zu stoppen, und einen Druckmesser, um den Perfusionsdruck zu kontrollieren. Vor und hinter der Leber werden Clark-Sauerstoffelektroden geschaltet, die den Sauerstoffpartialdruck des Perfusionsmediums vor seinem Eintritt in die Leber sowie nach dem Passieren messen. Die Kapseldispersion gelangt durch die *Vena portae* (Portalvene, Pfortader) in die Leber. Die *Arteria hepatica propria* (Leberarterie) ist verschlossen. Der Austritt erfolgt über die *Vena Cava* (Hohlvene). Von dort fließt die Perfusionslösung wieder in den Vorratsbehälter ein. Die Leber befindet sich während des gesamten Durchlaufs mit einer Dauer von zwei Stunden in einem bei 37°C temperierten Wasserbad.

Das Gesamtvolumen des Systems beträgt rund 250 ml, welches sich aus dem Anfangsvolumen der Kapseldispersion mit Pufferlösung (100 ml im Vorratsbehälter) und dem Kreislauf-

volumen der Perfusionsanlage (~ 150 ml Krebs-Henseleit-Puffer in Schläuchen, Membran-oxygenator, Elektrodenkammern, Blasenfalle, etc.) zusammensetzt. Daraus ergibt sich eine Konzentration von ungefähr 600 µl Perfluordecalin in 250 ml Perfusionsmedium. Für die physiologischen Untersuchungen werden während jedes Experiments im 5-Minuten-Rhythmus der pH-Wert, der Perfusionsdruck sowie die Sauerstoffpartialdrücke aufgezeichnet. Des Weiteren wird alle 15 Minuten eine Probe gezogen, um mittels einer Blutgasanalyse zum Einen den Gehalt an Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridionen und zum Anderen die freigesetzte Lactat- und Glucosekonzentration zu überprüfen. Zusätzlich wird mit einem Laborautomaten die Intensität der Enzymfreisetzung von Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) gemessen. Als Referenz dient je ein vorgeschalteter Kontrolldurchlauf mit reinem Krebs-Henseleit-Puffer als Perfusionsmedium, bei dem in gleicher Weise Informationen über die physiologischen Umgebungsparameter eingeholt und in die spätere Auswertung als Vergleichswerte mit einbezogen werden. Für die anstehenden Particle Tracking- und NMR-Messungen werden pro Perfusionsdurchlauf bis zu 5 Proben bereitgestellt. Hierzu werden in bestimmten zeitlichen Intervallen (nach 0, 30, 60, (75), 90, 120 Minuten) geringe Mengen Perfusionsmaterial aus dem System entnommen, woraus sich folgende Messreihen ergeben:

LPI: nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPI 0min, 30min, 60min, 90min, 120min

LPII: nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPII 0min, 30min, 60min, 90min, 120min

LPIII: nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPIII 0min, 30min, 60min, 90min, 120min

LPIV: nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPIV 0min, 30min, 60min, 75min.

3.5.4.1 Leberperfusion – Particle-Tracking-Messungen

Für die Particle-Tracking-Messungen werden die Proben der Messreihen LPI bis LPIV wie in Kapitel 3.5.1.5 beschrieben vorbereitet. Angaben über individuelle Messparameter einzelner Proben können den Tabellen 6.10 bis 6.13 im Anhang entnommen werden.

3.5.4.2 Leberperfusion – NMR-Experimente

Zur Konzentrationsbestimmung des Fluorgehalts der Proben der Messreihen LPI bis LPIV werden diese mit 10% D₂O versetzt und mittels beschriebener Einpuls-Experimentiertechnik (vgl. Kapitel 3.5.3.2) am DRX500 Spektrometer mit einem 5 mm BB-HR-Messkopf und auf ¹⁹F-getunter ¹H-Entkopplerspule vermessen. Zur Datenauswertung wird TOPSPIN genutzt.

Eine Auflistung der insgesamt verwendeten Geräte ist im Anhang zu finden.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle-Tracking-Messungen der vier Grundsynthesen

Im Vergleich zu regulären Verfahren wie der statischen oder dynamischen Lichtstreuung als Standardmethode für die Größenbestimmung suspendierter Partikellösungen weist das Particle Tracking in Form einer direkten Messtechnik den wesentlichen Vorteil auf, durch individuelle optische Verfolgung der Partikel sowohl einzelne Partikelradien als auch Radienverteilungen zu ermitteln.¹⁴¹ Um jedoch auf diese Weise Einzelradien zu erfassen, ist ein gewisser Aufwand bezüglich der Probenvorbereitung und während der Messung selbst zu betreiben, wodurch sich eine Reihe möglicher Fehlerquellen ergibt, die eine Verfälschung der Messergebnisse verursachen können.

Wie bei den standardisierten Verfahren ist es auch hier wichtig, die Probe für die Messung ausreichend zu verdünnen. Eine zu hohe Partikelkonzentration verschlechtert zum Einen den erforderlichen Teilchen-Hintergrundkontrast durch Überlagerungen von Partikelebenen bei hohen Schichtdicken oder Verklebungen von Partikeln an den Glasinnenflächen der Messzelle, zum Anderen erschweren zu viele Partikel aufgrund von häufigen Kollisionen und/oder Überschneidungen ihrer Wege die gezielte Verfolgung individueller Partikelpfade und können zu einer Überladung von Dateninformationen und damit zu einem Systemabbruch führen. Zudem sollte sich der Brechungsindex der Partikel deutlich von dem des Mediums unterscheiden. Eine weitere Voraussetzung betrifft die Dichte des Partikelmaterials. Diese sollte ähnlich der Dichte des Mediums sein, um ein Absinken oder Aufsteigen der Teilchen während der Messung zu verhindern und die Brown'sche Molekularbewegung sicher zu stellen. Unbewegliche Objekte werden zwar vom Detektionssystem als solche erkannt und aus der Berechnung eliminiert (vgl. Kapitel 3.5.1.4), können jedoch zu den oben genannten Hintergrund-Störeffekten beitragen und auf diesem Weg die Messung erschweren. Für ein repräsentatives Ergebnis wird die Probe über einen längeren Zeitraum von ca. 45 Minuten beobachtet. Um einen möglichst breiten Überblick über die in der Probe enthaltenen Partikelgrößen zu erhalten, müssen möglichst viele Teilchen erfasst werden. Dafür wird der Messausschnitt nach jeder Aufnahme positionell verändert, so dass sich ein guter Querschnitt über das gesamte Sichtfenster der Messzelle ergibt. Da mit dem Particle Tracking nur die Teilchenbewegungen in xy-Richtung detektiert werden und mit dem Streulicht einer herkömmlichen Mikroskoplampe gearbeitet wird, ist es wichtig, dass die Schichtdicke der Probe gering gehalten und so das Auftreten von Unschärfen minimiert wird. Abweichungen in z-

Richtung können das Messergebnis verfälschen, wenn Partikel aus dem Fokus verschwinden und beim Wiedereintritt in die Beobachtungsebene als „neue“ Teilchen registriert werden. Für die Gewährleistung einer konstanten Schichtdicke wird die Messzelle während der Probenvorbereitung mit definierten Gewichten präpariert (vgl. Kapitel 3.5.1.5). Trotzdem kann es infolge von Unebenheiten der verwendeten Gläser (Objekträger, Deckglas) zu Unterschieden in der Probenhöhe kommen. Daher wird während der Messung die Schichtdicke in regelmäßigen Abständen dokumentiert und später in den Berechnungen berücksichtigt. Ebenso wird mit dem Anstieg der Probentemperatur im Verlauf der Messung verfahren. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt eine Zunahme der kinetischen Energie der Teilchen. Durch die gesteigerte Bewegungsgeschwindigkeit vergrößert sich das Verschiebungsquadrat in Gleichung 13 (siehe Kapitel 3.1.5.3) und der daraus resultierende Wert für den Radius fällt geringer aus als er tatsächlich ist. Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich aus Lufteinschlüssen innerhalb des Probenvolumens bzw. durch Zufuhr von Luft bei nicht vollständig verschlossenen Messzellen, so dass – ähnlich einem Temperatur- oder Konzentrationsgradienten – Strömungen entstehen können, die wiederum die Driftgeschwindigkeit sowie die Bewegungsrichtung der Partikel beeinflussen und im Extremfall den Abbruch der Messung erzwingen. Eine zusätzliche Gefahrenquelle, unerwünschte Strömungen herbeizuführen, birgt die Empfindlichkeit der Probe auf jegliche Art von Bewegung oder Erschütterung, die beispielsweise bei der Justierung eines neuen Messausschnitts auftreten können. Daher ist es ratsam, nach einem Positionswechsel zu warten bis sich die Probe beruhigt hat, um anschließend mit einer weiteren Aufnahme fortzufahren. Ein allgemeiner Fehler, den sowohl die statischen und dynamischen Lichtstreuungsverfahren als auch die Methode des Particle Tracking gemein haben, besteht in der Annahme einer kugeligen, sphärischen Gestalt der dispergierten Partikel. Andersgeartete Geometrien können aufgrund der Stokes-Einstein-Gleichung nicht berücksichtigt werden.

Bei der Auswertung der Messergebnisse der Proben der vier unterschiedlichen Synthesestrategien für die Entwicklung von Kapselstrukturen im Nanometermaßstab geht es in erster Linie darum, Informationen über die prinzipiell möglichen Größenordnungen und damit über den dispersen Zustand der Proben zu erhalten. Lassen sich anhand der Partikelgrößen bzw. der Größenverteilungen konkrete Unterschiede in Abhängigkeit von den einzelnen Herstellungsmethoden (technisches Verfahren, theoretischer Hintergrund) oder dem verwendeten Kern-/Wandmaterial ausmachen? Kann die vorgegebene maximale Partikelgröße, die sich mit der Aussicht auf eine medizinische Zielrichtung an der Größenordnung des Durchmessers kleinster Arterien ($< 4 \mu\text{m}$) orientiert, eingehalten und bestenfalls unterschritten werden? Und nicht zuletzt – sind die Resultate reproduzierbar?

Pro Synthesetechnik werden jeweils drei Proben hergestellt, die anhand von Mess- oder Probenreihen klassifiziert und nach entsprechender Verdünnung mit dest. Wasser mittels Particle Tracking untersucht werden. Die Messungen erfolgen innerhalb von 24 Stunden nach der Synthese.

4.1.1 Ergebnisse und Diskussion der Präparation perfluordecalingefüllter PBCA-Nanokapseln (mittels Ouzomethode)

Nach der hier angewandten Präparationstechnik werden die Partikel gemäß der Theorie des Ouzo-Effekts ohne die Einwirkung erheblicher mechanischer Kraftanstrengungen dargestellt (vgl. Kapitel 3.1.2). Basierend auf dem Prozeß der Nukleation- und Keimbildung werden kleinste Perfluordecalintropfen von einer Polymerhülle aus Butylcyanacrylat eingeschlossen, um in wässriger Lösung dispergiert vorzuliegen. Nach abgeschlossener Synthese erhält man eine einheitliche, milchig-trübe und optisch stabile Dispersion.

Die auf diese Weise produzierten Proben setzen sich zu Messreihe A wie folgt zusammen:

1. Probe: Messung $nk(O)_{PBCA/PFD}1$ PT
2. Probe: Messung $nk(O)_{PBCA/PFD}2$ PT
3. Probe: Messung $nk(O)_{PBCA/PFD}3$ PT

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen werden in Form von Radienhistogrammen im Anhang in den Abbildungen 6.1 bis 6.3 aufgezeigt. An dieser Stelle sind die Verteilungen zusammenfassend durch das nachstehende Gemeinschaftshistogramm (siehe Abbildung 4.1) graphisch wiedergegeben. Solch einem Histogramm können neben Informationen über die gegebenen Größen- und Häufigkeitsverhältnisse mithilfe eines Gaußfits Werte für den durchschnittlichen Radius und die Halbwertsbreite entnommen werden, welche in Tabelle 4.1 aufgeführt sind.

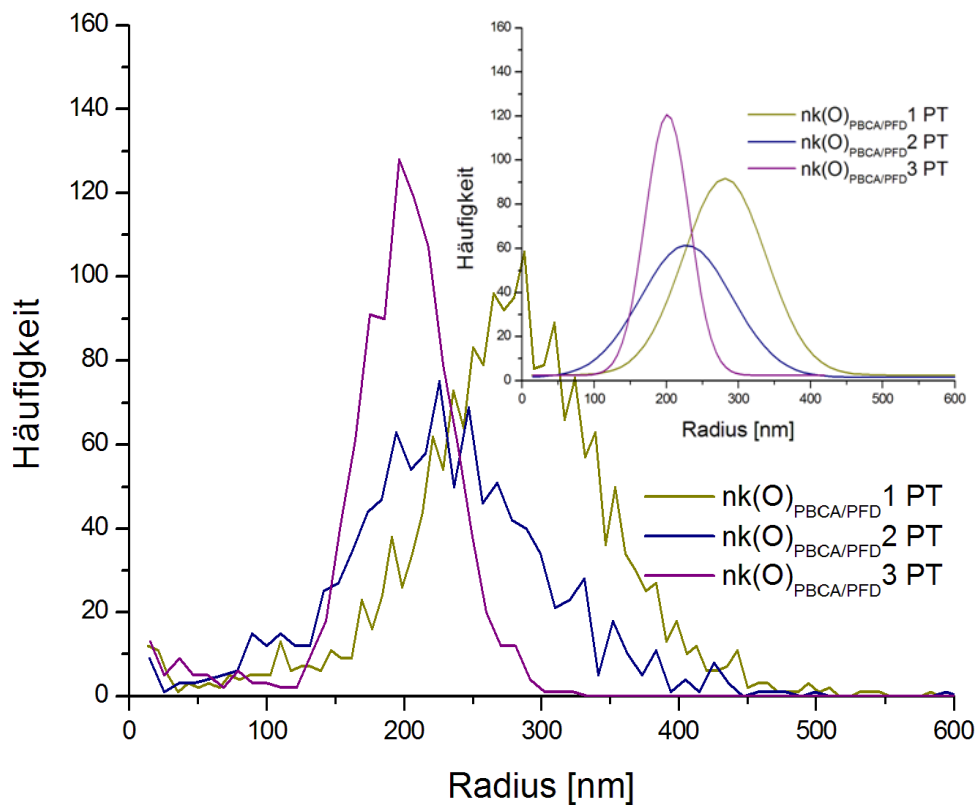


Abbildung 4.1: Größenverteilungen der Messreihe A. Oben rechts: Normalverteilungen der Messreihe A.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Messreihe A

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$nk(O)_{PBCA/PFD} 1 \text{ PT}$	281 ± 1	115 ± 3
$nk(O)_{PBCA/PFD} 2 \text{ PT}$	228 ± 2	127 ± 5
$nk(O)_{PBCA/PFD} 3 \text{ PT}$	201 ± 1	61 ± 2

Kollektiv betrachtet lässt sich der Größenbereich der Messreihe A bei ausreichend hoher Häufigkeit auf eine Gesamtverteilungsbreite mit Radienwerten zwischen 140 nm und 360 nm eingrenzen. Wie aus Abbildung 4.1 hervorgeht, ergibt sich diese Spannweite durch Überschneidungen der einzelnen Kurven; in der Hauptsache durch Messungen 1 und 3, wobei Probe 1 mit einem mittleren Radius von rund 280 nm im Vergleich zur Probe 2 mit nahezu 230 nm eine leichte Rechtsverschiebung und die größten Partikel, Probe 3 mit einem Durchschnittswert von ca. 200 nm eine Linksverschiebung und damit die kleinsten Partikel aufweist. Mit einer Halbwertsbreite von rund 60 nm besitzt Letzere zudem die schmalste Verteilung.

lungsbreite und folglich den höchsten Grad an Monodispersität. Die leichten individuellen Unterschiede lassen sich auf die eingangs erwähnten Messfehler zurückführen. Diese fallen jedoch, in Anbetracht der ausgeprägten Überlagerungspassagen und aufgrund der Tatsache, dass die Verteilung der Messung 2 ausschließlich die Ergebnisse der beiden anderen Proben bestätigt, sehr gering aus und sind daher zu vernachlässigen. Die Häufigkeitsmaxima liegen generell in einem zufriedenstellenden Bereich, was bedeutet, dass sehr viele Teilchen detektiert werden konnten, um zu einem repräsentativen Ergebnis beizutragen.

4.1.2 Ergebnisse und Diskussion der Präparation perfluordecalingefüllter PLGA-Nanokapseln (mittels Ouzomethode)

Auch die Proben dieser Messreihe wurden mit Hilfe der Ouzo-Technik hergestellt. Anstelle von Polybutylcyanacrylat wurde allerdings das Polymer Polylactid-co-Glycolid zum Aufbau der Kapselwand verwendet (vgl. Kapitel 3.1.3). Nach Beenden der Synthese erhält man auch hier milchig-trübe, wässrige Dispersionen. Daraus ergibt sich Messreihe B mit:

1. Probe: Messung $nk(O)_{PLGA/PFD}1$ PT
2. Probe: Messung $nk(O)_{PLGA/PFD}2$ PT
3. Probe: Messung $nk(O)_{PLGA/PFD}3$ PT

Die Einzelergebnisse sind den Abbildungen 6.4 bis 6.6 im Anhang zu entnehmen. Eine graphische Gegenüberstellung der Messwerte aller drei Proben folgt als Gemeinschaftshistogramm in Abbildung 4.2. Die Ergebnisse der Gaußanalyse sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

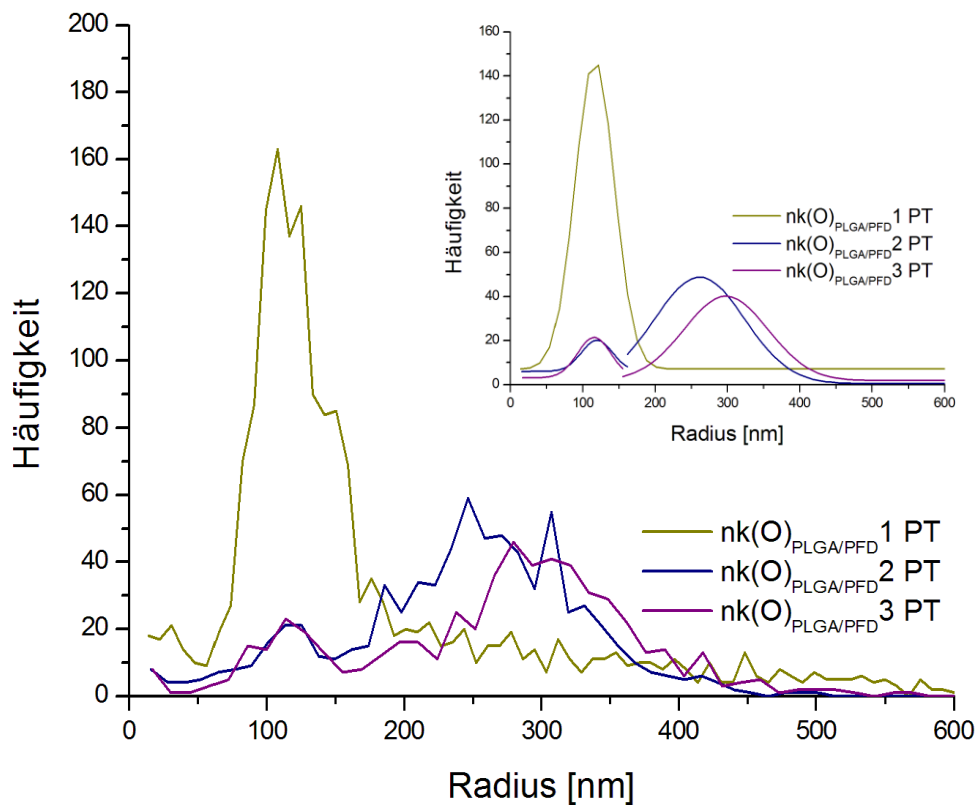


Abbildung 4.2: Größenverteilungen der Messreihe B. Oben rechts: Normalverteilungen der Messreihe B.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Messreihe B

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$nk(O)_{PLGA/PFD} 1 \text{ PT}$	116 ± 1	54 ± 2
$nk(O)_{PLGA/PFD} 2 \text{ PT}$	$120 \pm 4 / 262 \pm 3$	$43 \pm 8 / 125 \pm 7$
$nk(O)_{PLGA/PFD} 3 \text{ PT}$	$116 \pm 3 / 298 \pm 3$	$46 \pm 9 / 116 \pm 7$

Im Gegensatz zur Messreihe A ist bei Messreihe B eine deutliche Diskrepanz zwischen den Radienverteilungen von Probe 1 und den beiden anderen Proben zu beobachten. Zwar kommt es auch hier zu Überschneidungen, der Anteil an größeren Partikeln ist in Probe 1 den Häufigkeiten zufolge jedoch zu gering (≤ 20), als dass er zu berücksichtigen ist. Die Hauptverteilungsbreite der Messung 1 liegt bei Radienwerten zwischen 80 nm und 160 nm mit einer mittleren Partikelgröße von ca. 116 nm und ist somit, im Vergleich zu den Proben 2 und 3, sehr stark links, im Bereich kleinerer Partikelgrößen, angesiedelt. Die Verteilungen der beiden anderen Proben verlaufen annähernd deckungsgleich und scheinen eine leichte

Bimodalität aufzuzeigen, wobei aber auch hier die Häufigkeitsmaxima innerhalb der Grenzen von Verteilung 1 sehr niedrig und damit zu vernachlässigen sind. Demnach ergeben sich für die Proben 2 und 3 Partikelgrößenverteilungen zwischen 180 nm und 380 nm mit durchschnittlichen Radianwerten um 260 nm respektive 300 nm. Gegenüber der sehr hohen Teilchenkonzentration der Probe 1 zwischen 100 nm und 130 nm (max. Häufigkeit ~ 160) schlagen die Häufigkeiten der Messungen 2 und 3 kaum zu Gewicht. Die geringen maximalen Häufigkeitswerte von 50 bis 60 sowie die relativ breite Ausdehnung der Verteilung (~ 200 nm vs. ~ 80 nm bei Verteilung 1) machen die Wahrscheinlichkeit von Störungen durch Messschwierigkeiten diskutabel, so dass die Resultate dieser Messungen unter Vorbehalt dem Gesamtergebnis der Probenreihe B anzurechnen sind.

4.1.3 Ergebnisse und Diskussion der Präparation miglyolgefüllter PBCA-Nanokapseln (mittels anionischer Grenzflächenpolymerisation)

Im Unterschied zu der vorangegangenen Präparationstechnik handelt es sich in diesem Fall um eine Synthesestrategie, bei der die Partikeldispersionen unter Zuhilfenahme eines mechanischen Dispergiermittels erzeugt werden. Hierbei läuft der Prozess der Tropfenbildung und Einkapselung nahezu simultan ab und wird durch die extremen Scherkräfte des Rotor-Statorrührers vorangetrieben (vgl. Kapitel 3.2.2). Ebenso wie zuvor weisen die auf diesem Weg produzierten Partikeldispersionen eine milchig-weiße Trübung auf und sind augenscheinlich stabil. Die daraus resultierende Messreihe C lautet an dieser Stelle:

1. Probe: Messung nk(RS)_{PBCA/Miglyol}1 PT
2. Probe: Messung nk(RS)_{PBCA/Miglyol}2 PT
3. Probe: Messung nk(RS)_{PBCA/Miglyol}3 PT

Auch hier sind die Histogramme einzelner Messungen im Anhang in den Abbildungen 6.7, 6.8 und 6.9 zu finden. Ihre graphische Zusammenfassung stellt Abbildung 4.3 dar. Entsprechend sind die Ergebnisse der Gaußanalyse der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

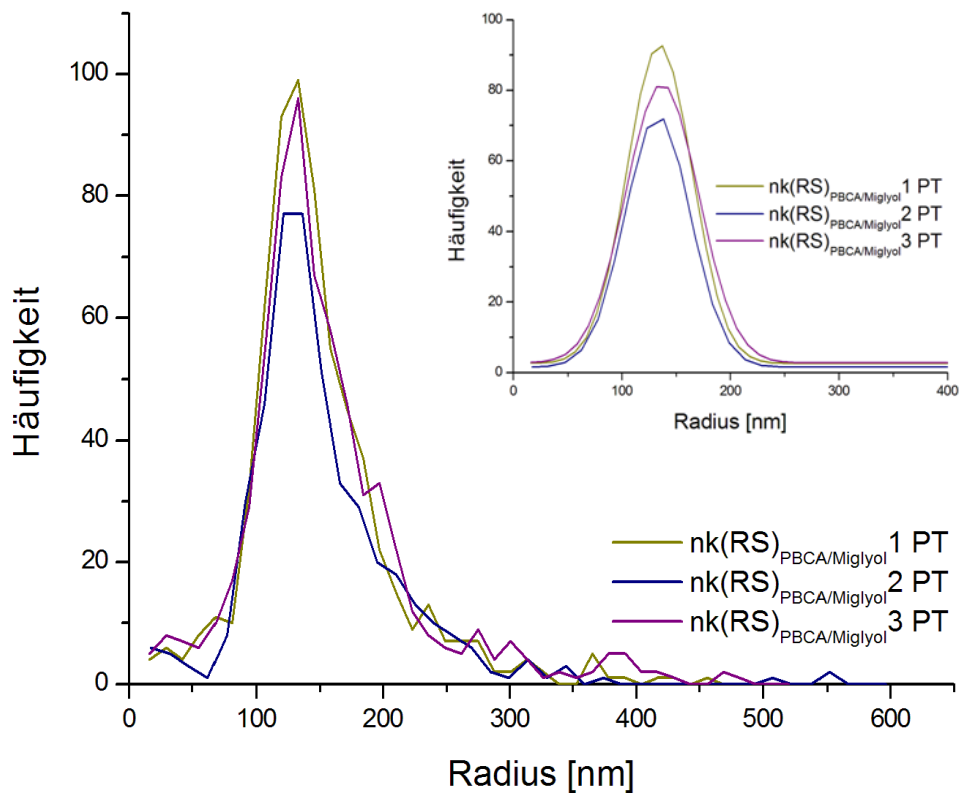


Abbildung 4.3 Größenverteilungen der Messreihe C. Oben rechts: Normalverteilungen der Messreihe C.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Messreihe C

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$\text{nk(O)}_{\text{PBCA/Miglyol}} 1 \text{ PT}$	135 ± 1	60 ± 3
$\text{nk(O)}_{\text{PBCA/Miglyol}} 2 \text{ PT}$	133 ± 1	61 ± 3
$\text{nk(O)}_{\text{PBCA/Miglyol}} 3 \text{ PT}$	137 ± 2	68 ± 3

Die Ergebnisse dieser Probenreihe weisen sehr gute Übereinstimmungen in den gemessenen Verteilungsbreiten und den daraus ermittelbaren Kenngrößen auf. Mit einer Hauptverteilung von ungefähr 80 nm bis 190 nm und einem durchschnittlichen Partikelradius von rund 135 nm stellen die Proben dieser Synthesestrategie ihre Reproduzierbarkeit deutlich unter Beweis. Zudem unterstützen hohe Häufigkeitswerte die Repräsentativität dieser Messungen.

4.1.4 Ergebnisse und Diskussion der Präparation perfluordecalingefüllter PLGA-Nanokapseln (mittels Lösemittelverdampfung)

Die Ergebnisse dieser Proben sind insofern interessant, als dass es hier zu einer direkten Gegenüberstellung zweier Synthesestrategien ($nk(O)_{PLGA/PFD}$ vs. $nk(LV)_{PLGA/PFD}$ bzw. Ouzo-Effekt/Nanopräzipitation vs. technische Emulgierung/Lösemittelverdampfung) kommt, bei denen mit identischen Kern- und Wandmaterialien gearbeitet wird, das Herstellungsprinzip jedoch ein anderes ist.

Im Unterschied zur Ouzo-Variante werden die Partikel bei dieser Methode durch Verdampfen des Lösemittels gebildet (vgl. Kapitel 3.2.2). Die dadurch entstandenen Dispersionen zeugen von keiner hohen Stabilität, da sich schon nach kürzester Zeit zwei getrennte Phasen ausbilden – eine niederschlagsähnliche weißlich-gelbe untere und eine leicht trübe, wässrige obere Phase. Der hierbei zu beobachtende Destabilisierungsprozess kann vermutlich auf Sedimentationseffekte, infolge des erheblichen Dichteunterschieds bei sehr großen Partikeln zwischen dem Kernmaterial Perfluordecalin (Dichte $\sim 1,93 \text{ g/cm}^3$, 25°C^k) und dem Dispersionsmedium Wasser (Dichte $\sim 0,997 \text{ g/cm}^3$, 25°C^l), zurückgeführt werden. Durch ein Schütteln der Proben ist zwar eine temporäre Redispergierung der Partikel möglich, die Dauer des dispersen Zustandes doch zu kurz, als dass eine Particle Tracking-Messung problemfrei durchzuführen wäre. Daher werden für die Messung lediglich die oberen Phasen verwendet, da in diesen Fällen eine Beobachtung der Brown'schen Teilchenbewegung wahrscheinlicher erscheint, als in den unteren, bereits sedimentierten und damit „immobilen“ Phasen.

Für die Aufstellung der Messreihe D ergibt sich:

1. Probe: Messung $nk(LV)_{PLGA/PFD}$ 1 PT
2. Probe: Messung $nk(LV)_{PLGA/PFD}$ 2 PT
3. Probe: Messung $nk(LV)_{PLGA/PFD}$ 3 PT

Die Histogramme der einzelnen Messungen sind im Anhang in den Abbildungen 6.10, 6.11 und 6.12 aufgeführt. Ein Vergleich aller drei Messergebnisse ist im nachstehenden Diagramm (Abbildung 4.4) wiedergegeben. Die entsprechenden Werte der Gaußanalyse sind in Tabelle 4.4 festgehalten.

^k Quelle: <http://www.akad.com.tr/Urunler/PDF/27ca05fd-641d-49a4-a.pdf>, 06.06.2012.

^l Quelle: http://www.wissenschaft-technik-ethik.de/wasser_dichte.html#kap02, 06.06.2012.

Bei einer Gegenüberstellung der Verteilungen der Messreihe D sind grundsätzlich Ähnlichkeiten hinsichtlich des Größenordnungsbereichs festzustellen. Hierbei kann zum Einen eine nahezu konforme Hauptverteilungsbreite mit Teilchenradien zwischen 70 nm und 230 nm , zum Anderen auch ein vergleichbares Ausdehnungsverhalten der Verteilungen über eine Länge von ungefähr 160 nm ausgemacht werden. Geringe Abweichungen davon zeigt Messung 3. Ihre Verteilung ist etwas schmaler und konzentriert sich im Wesentlichen auf den Größenbereich zwischen 90 nm und 220 nm , liegt damit aber innerhalb der Messwerte von Messung 1 und 2. Auch bei einem Vergleich der Gaußschen Mittelwerte ergibt sich ein konformes Bild mit eng beieinanderliegenden Spitzenwerten von rund 124 nm für Probe 1, 136 nm für Probe 2 und 150 nm für Probe 3.

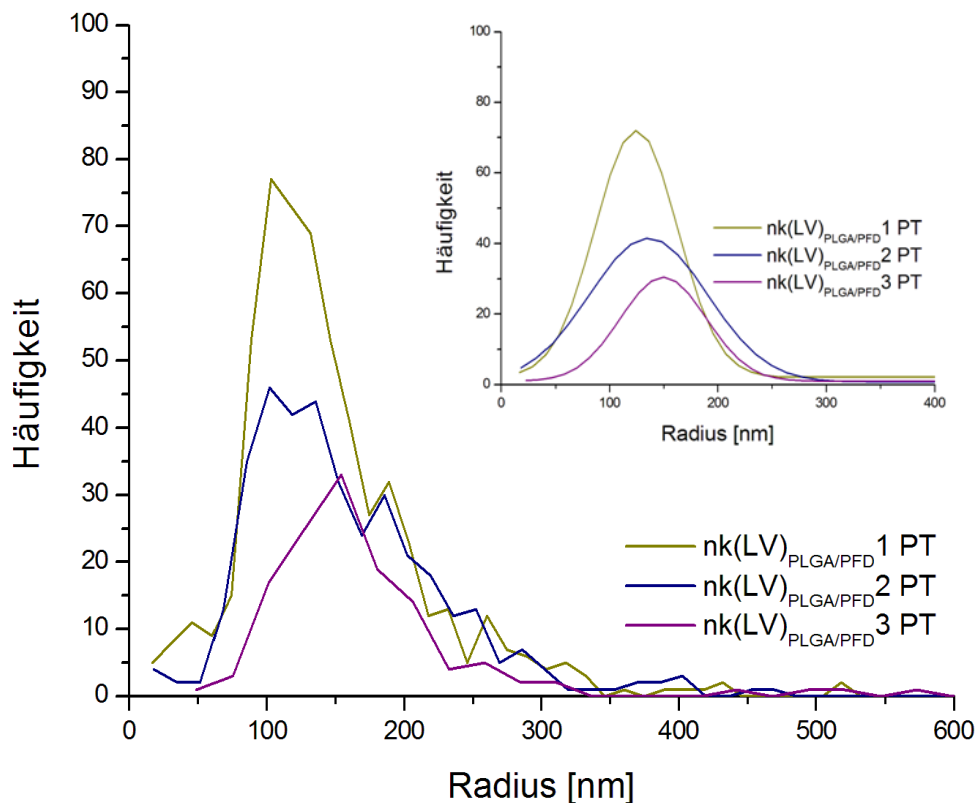


Abbildung 4.4: Größenverteilungen der Messreihe D. Oben rechts: Normalverteilungen der Messreihe D.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Messreihe D

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
nk(LV) _{PLGA/PFD} 1 PT	124 ± 2	74 ± 5
nk(LV) _{PLGA/PFD} 2 PT	136 ± 3	109 ± 7
nk(LV) _{PLGA/PFD} 3 PT	150 ± 3	79 ± 6

Deutlichere Unterschiede machen sich bei einer Betrachtung der Häufigkeiten bemerkbar, die sich anhand der Problematik der Messbarkeit dieser Probenreihe erklären lassen. Die niedrigen Häufigkeitswerte, die vor allem bei Probe 3 und auch Probe 2 auftreten, können auf das zuvor beschriebene Sedimentationsverhalten aufgrund des Dichteverhältnisses zurückgeführt werden. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Konzentrationsabnahme noch dispergierter, also beweglicher und damit messbarer Teilchen in der oberen Phase. Zudem sind aber auch die bis dahin verbliebenen Partikel von einem fortschreitenden Absinken betroffen, was eine weitere Teilchenreduktion während der Messung nach sich zieht und unter dem Mikroskop direkt beobachtet werden kann. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der sehr schlechten Sichtbarkeit der Teilchen. Dieses Problem zeigt sich zwar in Relation mit den extrem gut detektierbaren ölfüllten Partikeln der Messreihe C bei allen perfluordecalinhaltigen Proben, tritt im hiesigen Fall jedoch in gravierendstem Ausmaß auf. Die Beobachtungsobjekte erscheinen verschwommen und ohne klaren Umriss, zurückzuführen auf einen unzureichenden Kontrast infolge ähnlicher Brechungsindices. Versuche, eine deutlichere Unterscheidung der Brechungsindizes durch Zugabe von Ethanol zum Medium hervorzurufen, zeigen keine ausschlaggebende Veränderung der Resultate. Als Folge der schlechten Sichtbarkeit können Strömungsbewegungen und damit einhergehende Verfälschungen der Messwerte unbemerkt bleiben.

In ihrer Gesamtheit zeigen die Messungen der Messreihe D zwar stimmige Größenprofile und erscheinen in dieser Hinsicht auch reproduzierbar, die Ergebnisse sind aber aufgrund der eben genannten Probleme mit Vorsicht zu genießen. Zwangsläufig hat ein Vergleich zwischen den Ergebnissen dieser Probenreihe und der Probenreihe B (nk(O)_{PLGA/PFD}) keine konkrete Aussagekraft. Eine Staffelung der Kurven (siehe Abbildung 4.5) ergibt immerhin eine gute Übereinstimmung bei den Proben nk(LV)_{PLGA/PFD}1, 2, 3 PT und nk(O)_{PLGA/PFD}1 PT, ob es sich jedoch um eine realistische Wiedergabe der Größenordnung handelt, ist zweifelhaft. Eine Konfrontation der beiden Darstellungsmethoden ist in diesem Fall und auf diesem Weg nicht möglich.

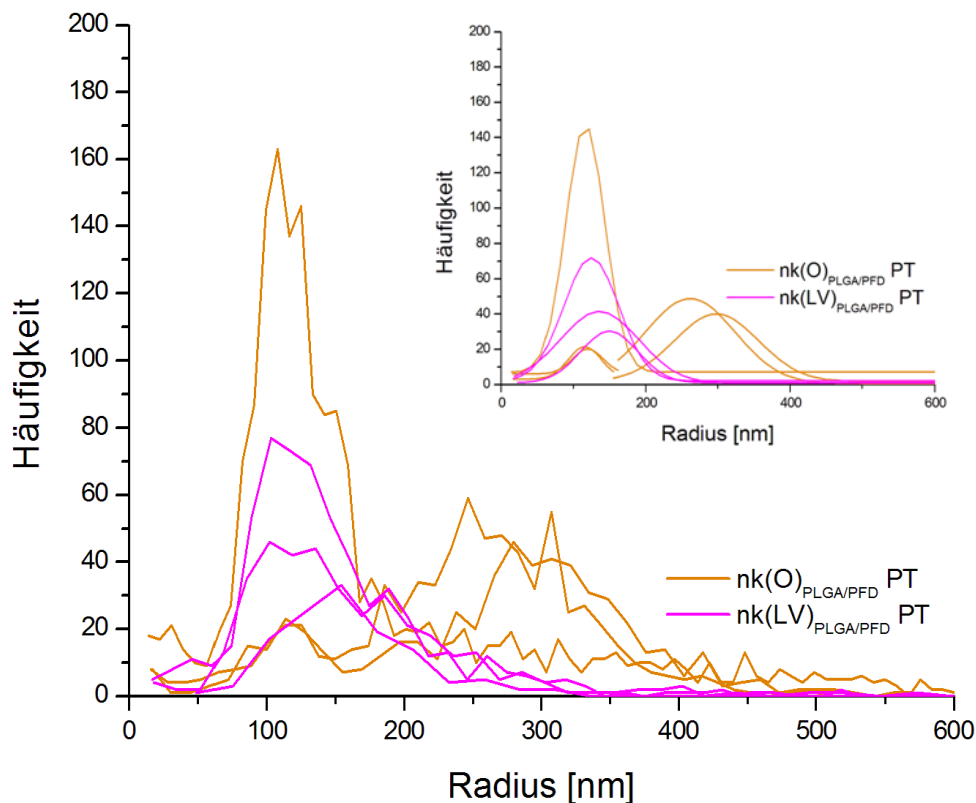


Abbildung 4.5: Vergleich der beiden Grundsynthesen Ouzotechnik vs. Lösemittelverdampfung bei gleichem Kern- und Wandmaterial durch Gegenüberstellung der Größenverteilungen der Messreihe B und D. Oben rechts: Normalverteilungen der Messreihe B und D.

Richtet man den Blick im Speziellen auf die Verteilungsbreiten der verschiedenen Proben, wie sie im nachfolgenden Diagramm aufgeführt sind, lassen sich die Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf überschaubare Weise zusammenfassen. Die Begrenzungslinien 1 und 2 in Abbildung 4.6 markieren den ermittelten Partikelgrößenbereich, welcher über die Umsetzung mit der konventionellen Rührtechnik für die miglyolgefüllten PBCA-Nanopartikel darstellbar ist. Die Proben $nk(RS)_{PBCA/Miglyol}$ repräsentieren die einheitlichsten und zugleich reproduzierbarsten Messergebnisse mit sehr schmalen Radienverteilungen ($r_{HV}^m_{1,2,3}$: 80 nm bis 190 nm) sowie entsprechend hohen Häufigkeitswerten und stehen damit beispielhaft für den erforderlichen Anspruch an Ergiebigkeit und Konstanz. Die Proben $nk(LV)_{PLGA/PFD}$, die durch die Emulgierungs- und Verdampfungs-technik hergestellt werden können, liegen mit einer gesamtgültigen Verteilungsbreite zwischen 70 nm und 230 nm – die Problematik der realistischen Wiedergabe für den Moment außer Acht gelassen – in einem ähnlichen, unwesentlich breiteren Größenbereich. Auch hier lassen sich die Messergebnisse wiederholen. Für die PFD-haltigen PLGA-Nanopartikeldispersionen, die mittels der Ouzo-Methode erzeugt werden können, erscheinen die Resultate mehr oder minder ambivalent. Für die Proben

^m HV: Hauptverteilung.

$nk(O)_{PLGA/PFD2}$ und $nk(O)_{PLGA/PFD3}$ PT besteht die Möglichkeit einer bimodalen Verteilung, wobei sich der Schwerpunkt in beiden Fällen deutlich auf den Bereich größerer Radienwerte, von 180 nm bis 380 nm , verlagert. Beide Verteilungen verlaufen bei relativ geringen Häufigkeiten annähernd deckungsgleich. Weitaus aussagekräftiger zeigen sich hingegen die Messergebnisse der Probe 1. Die Verteilung ist monomodal und weist mit einer Breite zwischen 80 nm und 160 nm und einer maximalen Häufigkeit von rund 160 von allen Probenreihen die schmalste Verteilung mit einer hohen Konzentration an regulär großen Partikeln auf. Ein Nachweis größerer Teilchen gemäß den Verteilungen 2 und 3 ist hierbei nicht gegeben. Etwas anders gestalten sich die Ergebnisse der ersten Synthesestrategie – Nanopartikel aus Perfluorodecalin und Polybutylcyanacrylat unter Anwendung der Ouzo-Technik. Die Verteilungen sind, ebenso wie die Verteilungen der Messungen $nk(O)_{PLGA/PFD 2}$ und $nk(O)_{PLGA/PFD3}$, im Gegensatz zu den übrigen Proben rechtsverschoben, mit größeren Partikelradien zwischen ungefähr 160 nm und 360 nm , unter Berücksichtigung leichter Schwankungen, so dass sie deutlich aus dem bisher maßgebenden Grenzbereich herausfallen.

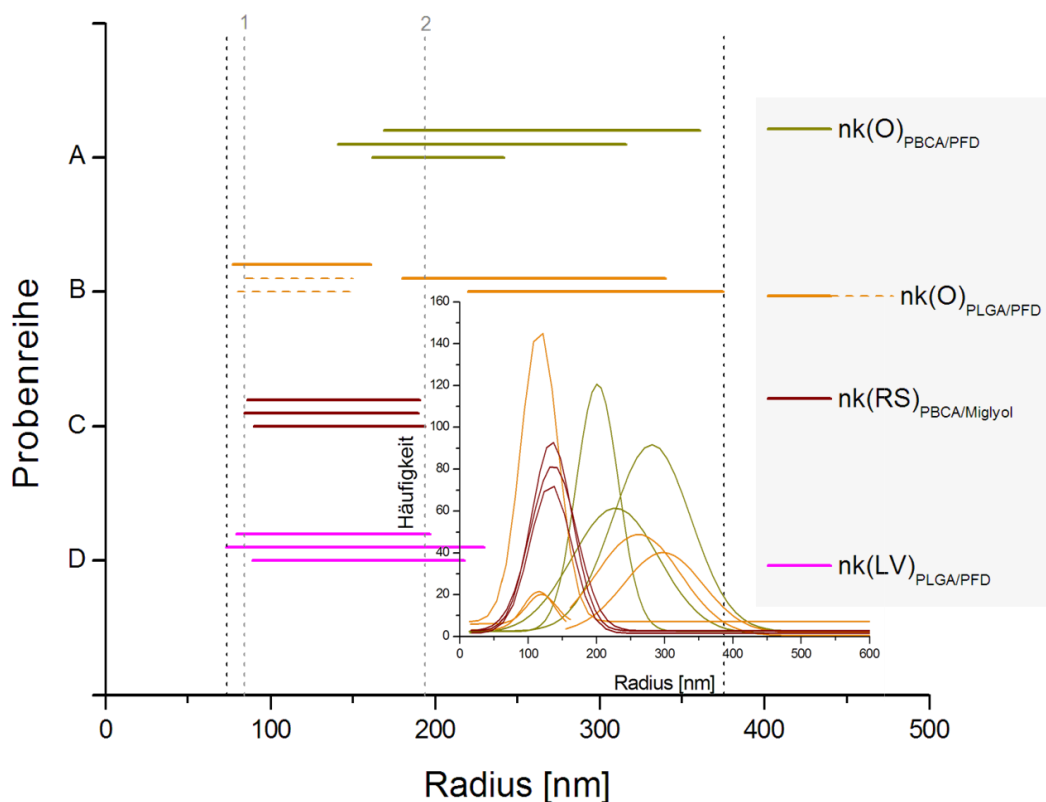


Abbildung 4.6: Auftragung der Hauptverteilungsbreiten aller Proben der vier Grundsynthesen. Die vertikalen schwarz-gestrichelten Linien stellen die untere und obere Grenze der Verteilungen insgesamt dar. Die vertikalen hellgrau-gestrichelten Linien 1 und 2 markieren den Verteilungsbereich der Synthese $nk(RS)_{PBCA/Miglyol}$. Die horizontalen gestrichelten Linien für die Proben $nk(O)_{PLGA/PFD}$ kennzeichnen ihre bimodale Verteilungsform. Das eingeschobene Diagramm zeigt die entsprechenden Normalverteilungen ohne die Messungen der Proben $nk(LV)_{PLGA/PFD}$.

Als Konsequenz ist zu vermuten, dass mit der Ouzo-Technik ein neuer, charakteristischer Partikelgrößenbereich erschlossen werden kann. Dieser scheint in Übereinstimmung mit Teilergebnissen der Messreihe B unabhängig vom verwendeten Mono- bzw. Polymer zu sein. Die Messungen selbst sind problemlos durchführbar, wobei mit PBCA als Kapselwandmaterial ein besserer optischer Kontrast für die Dunkelfeldmikroskopie erzielt werden kann. Die Ergebnisse der Messungen sind reproduzierbar. Die erhaltenen Partikelgrößen liegen deutlich unterhalb der geforderten Maximalgröße und sollten sich unter dieser Voraussetzung für weitere medizinische Untersuchungen eignen.

4.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der vier Grundsynthesen

Bei der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung der Proben werden die Partikel mittels sogenannter Einkerbungsversuche auf ihre Festigkeit bzw. Elastizität hin überprüft. Handelt es sich um Nanokapseln mit der beabsichtigten Kern-Schale-Struktur, sollte sich bei idealen Versuchsbedingungen eine charakteristische Faltung der Partikeloberfläche zeigen. Hierzu wird die Messspitze des AFM soweit auf die Probenoberfläche herabgesenkt, dass die Spitze die Hülle eines einzelnen Partikels durchdringt, um anschließend in die Ausgangsposition zurückzukehren. Der daraus resultierende Kraftverlauf kann anhand von Kraft-Weg-Kurven verfolgt werden (siehe dazu Kapitel 3.5.2.4).

Nun können auch bei dieser analytischen Methode Interpretationsschwierigkeiten infolge von Messfehlern oder Artefakten auftreten, die sich beispielsweise durch Ungenauigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Spitzenposition bzw. durch Abweichungen in der Ausrichtung der Piezostellelemente ergeben, so dass der Auftreffpunkt der Spitze nicht dem Kapselmittelpunkt entspricht. Ebenso können Umgebungseinflüsse eine Verschiebung zwischen Spitze und Probenoberfläche bewirken. Zu weiteren Fehlern können Materialanhaftungen an der Messsonde, Unzulänglichkeiten bei der Kalibrierung der Sensitivität oder auch Abweichungen zwischen reeller und berechneter Federkonstante des Cantilevers führen.¹⁴⁵

Zum Vergleich werden die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen vor und nach dem Einkerbungsexperiment einander gegenübergestellt, so dass eine mögliche optische Veränderung der partikulären Struktur den „fotografischen“ Abbildungen direkt entnommen werden kann, die sich aus dem Height- und Errorbild und dem korrespondierendem Höhenprofil (Cross-Section) zusammensetzen. Zur eingehenderen Untersuchung des kraftspektroskopischen Experiments werden Kraft-Weg-Diagramme angefügt, in denen die vertikale Kraft gegen die Spitzenposition, also die vertikale Position des Cantileverhalters korrigiert um die

Cantileverauslenkung aufgetragen wird. Für die Messungen werden die Proben mit destilliertem Wasser verdünnt, auf einem Glasträger eingetrocknet, mit Ethanol abgewaschen und anschließend erneut eingetrocknet. Für die Auswertung werden pro Synthesestrategie zwei Beispielmessungen aufgeführt.

4.2.1 Ergebnisse und Diskussion der Präparation perfluordecalingefüllter PBCA-Nanokapseln (mittels Ouzomethode)

Die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an der Probe $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ zeigen im guten Mittel Partikel mit Durchmessern von ungefähr 200 nm in zwei Dimensionen und rund 100 nm in der Höhe (vgl. Partikel $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ AFM1 und $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ AFM2 in den Abbildungen 4.7 vorher und 4.8 vorher). Diese unsymmetrische und auf den ersten Blick nicht sphärische Größenbeziehung von ca. 2:1 ist zum Einen eine Folge des Eintrocknens, zum Anderen können sich beim Abtastvorgang Deformationseffekte ergeben, die auf den zyklischen Kontakt zwischen Spitze und Partikeloberfläche zurückzuführen sind. Des Weiteren kann es aufgrund der Spitzengeometrie sowie der Spitzengröße passieren, dass Rundungen nicht exakt wiedergegeben werden und beispielsweise in der Cross-Section nur als steile Kanten dargestellt werden können. Letzteres ist anhand des Höhenprofils des ersten Partikels (Partikel $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ AFM1, Abbildung 4.7) zu erkennen. Für beide Partikel zeigen die Aufnahmen vor dem Eindrückexperiment vergleichbare Strukturen mit nahezu glatter Oberfläche.

Nach dem Experiment sind nach erneutem Abrastern dieser Partikel deutliche Veränderungen der Oberflächenstruktur zu beobachten. In beiden Fällen zeigt sich ein ähnliches Bild – eine Art Faltung, die sich fast über die gesamte Partikellänge erstreckt. Dieses kerbenähnliche Muster ist auch sehr deutlich im jeweiligen Höhenprofil zu erkennen. Zum Einen spiegelt sich das in der Abnahme der Partikelhöhe auf maximal 60 nm bis 70 nm wieder, zum Anderen kann eine leichte Verbreiterung um ca. 50 nm bei Partikel 1 respektive 25 nm bei Partikel 2 verzeichnet werden. Zudem unterstützt die recht schmale und mittig angelegte Vertiefung von knapp 50 nm die erwartete kapselcharakteristische Einkerbungsoptik.

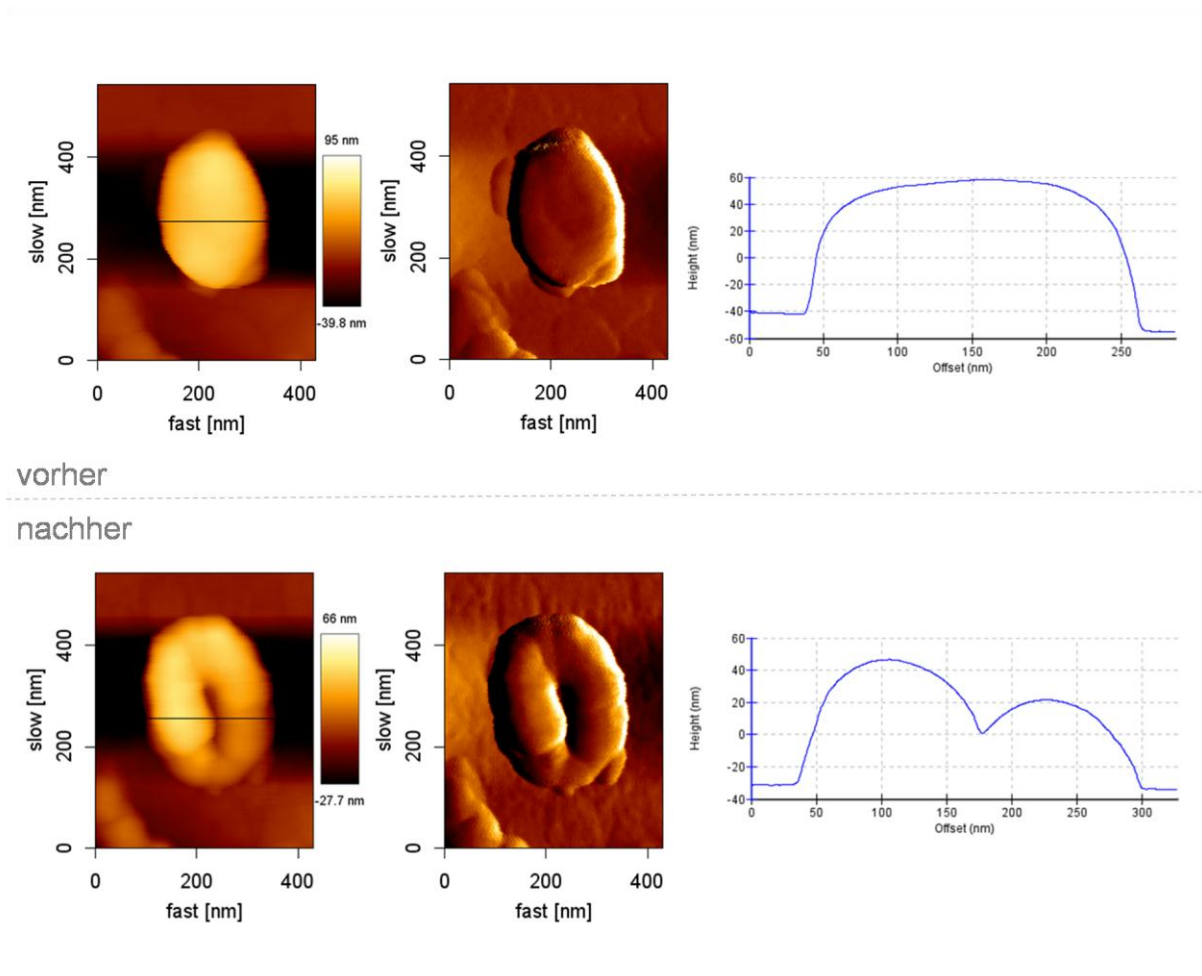


Abbildung 4.7: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

Dieses Verhalten ist mit der Vorstellung zu vereinbaren, dass eine fortschreitende Kompression durch die Messspitze eine Verdrängung von Materie bewirkt, so dass der partikuläre Körper nach Entfernen der Spitze eine plastische Verformung erfährt. Es ist zu vermuten, dass im Fall einer Nanokapsel mit Kern-Schale-Gerüst die Partikelwand aufgrund der komprimierenden, senkrecht wirkenden Kräfte im unteren Bereich aufplatzt bzw. aufbricht. Dadurch könnte zum Beispiel das flüssige Perfluorodecalin aus dem Kapselinneren austreten und den Höhenverlust sowie die seitliche/horizontale Ausdehnung als Folge eines „Zusammenfalls“ erklären. Denkbar wäre aber auch, dass Deformierungen auftreten ohne dass es zu einer Zerstörung der Kapselhülle kommt; in etwa vergleichbar mit der irreversiblen, gefalteten Dellenbildung bei einem Tischtennisball nach einer gewissen Druckbelastung. Für den Fall einer durchgehend festen Partikelstruktur, sprich Nanosphären oder reinen Polymerpartikeln, wären bei entsprechend hohem Kraftaufwand entweder ein Auseinanderbrechen des Partikels oder lediglich die Abbildung des Spitzenabdrucks bzw. ein Lochmuster zu erwarten.

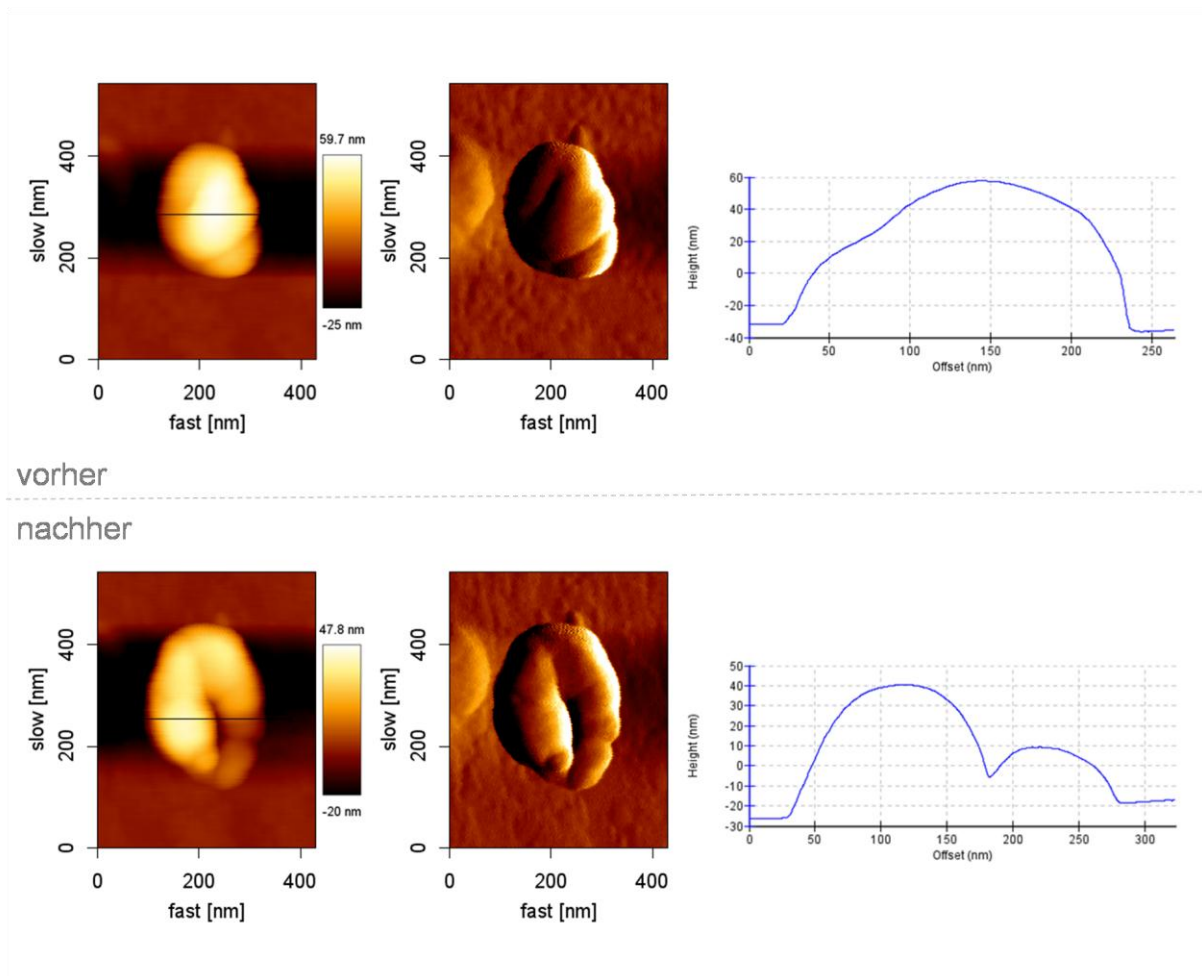


Abbildung 4.8: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

Dass es sich im aktuellen Beispiel um kapselgleiche Strukturen handelt, kann mit Hilfe des aus den kraftspektroskopischen Untersuchungen hervorgegangenen Kraftkurvenverlaufs untermauert werden. Hierzu sind in Abbildung 4.9 die Kraft-Weg-Kurven beider Messungen aufgetragen. Die Kurven beschreiben einmal den Hinweg der Spitze (trace), also das Eindringen in das Partikel (gelesen von rechts nach links) sowie ihren Rückweg (retrace, gelesen von links nach rechts). Die Hauptinformationen sind im Wesentlichen dem Verlauf der Trace-Kurve zu entnehmen, welche dazu in drei Abschnitte unterteilt werden kann. Zunächst muss die Spitze den über der Kapsel vorhandenen Tensidfilm überwinden, das heißt, dass es zu Beginn erst einmal zu einem meist kurzstreckigen und relativ geringen Kraftanstieg kommt, bevor das bereits beschriebene In-Kontakt-Springen (siehe Kapitel 3.5.2.4), hier bei einer relativen Cantileverhöhe von etwa $3,15 \mu\text{m}$, erfolgen kann (vgl. trace-Kurven im Vergrößerungsausschnitt in Abbildung 4.9). Von da an ist ein recht steiler Anstieg der Kraft zu beobachten, aus dem sich eine gewisse, lokale Resistenz der Kapselhülle gegen die Deformation durch die Messspitze ableiten lässt. Der sich daran anschließende Steigungseinbruch, gekennzeichnet durch einen Bereich in dem die trace-Kurven einen nahezu horizontalen Verlauf annehmen, entspricht demzufolge einer geringeren Resistenz gegen das Ein-

dringen der Spitze. Übertragen auf das Bild einer Nanokapsel ist die Spitze nun auf Höhe des Kapselkerns angelangt, der wegen seines flüssigen Charakters kaum bzw. nur sehr wenig Widerstand gegen das Eindringen leisten kann. Ist der Kern passiert, ist ein erneuter Kraftanstieg zu verzeichnen, der schließlich bei konstanter Spitzenposition mit maximaler Steigung nahezu senkrecht verläuft. Hierbei kann es sich um das Auftreffen der Spitze auf einen harten, inkompressiblen Untergrund wie beispielsweise der Trägeroberfläche oder vielleicht auch dem Kapselboden handeln. Aus der Differenz der Spitzenpositionswerte am Kurvenendpunkt und dem Nulldurchgang (nach dem jump to contact) lassen sich Rückschlüsse auf die maximale Eindringtiefe der Spitze ziehen. Diese kann im hiesigen Fall mit Werten von ungefähr 100 nm mit den gemessenen Kapselhöhen vor dem Einkerbungsversuch in Einklang gebracht werden, so dass von einer nahezu vollständigen Durchdringung der Partikel ausgegangen werden kann. Allerdings scheint sich der untere Kapselbereich nach oder während des Entferns der Spitze wieder zu schließen, zieht man die Ergebnisse der Cross-Section mit in Betracht. Dort wird eine Vertiefung von maximal 50 nm angegeben, so dass dem Vorgang ein gewisser Grad an Reversibilität bzw. Elastizität zugeschrieben werden könnte.

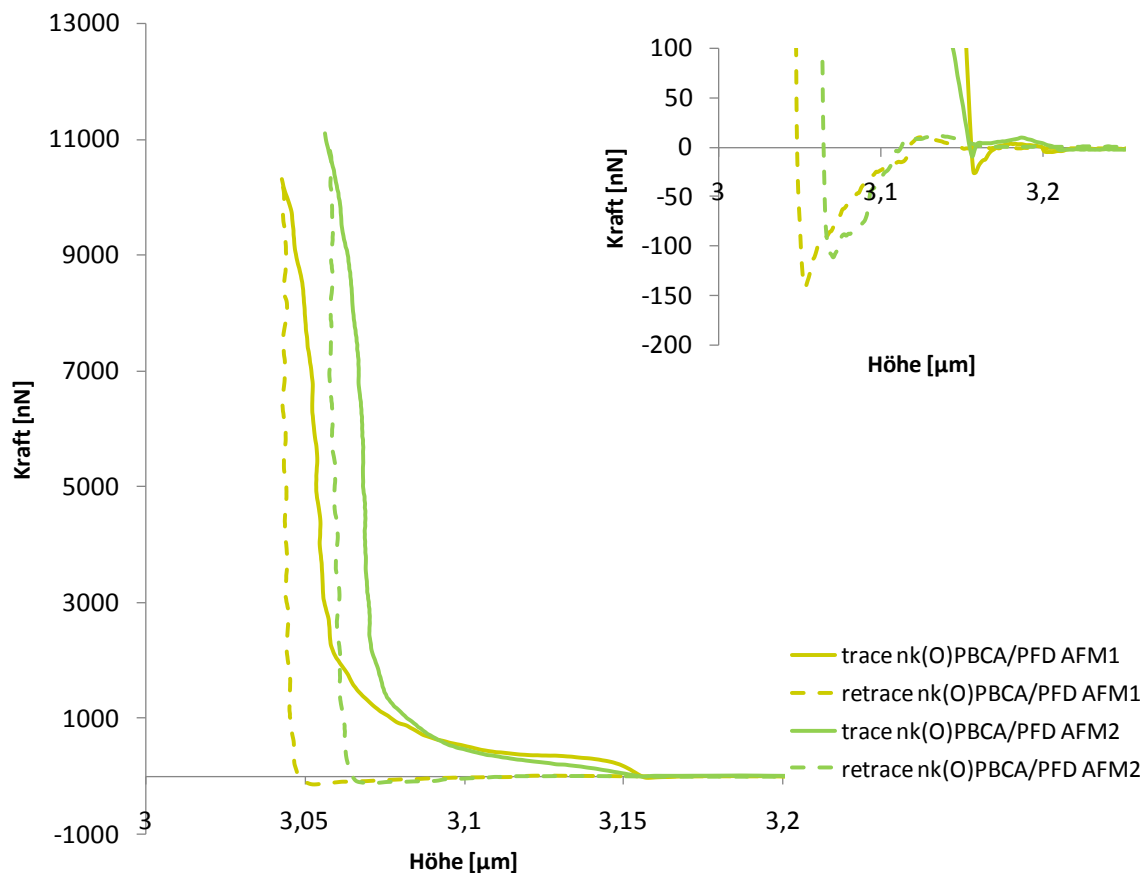


Abbildung 4.9: Kraft-Weg-Diagramm aus den Einkerbungsexperimenten an der Probe $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$. Oben rechts: Vergrößerung des Kurvenverlaufs im Bereich des jump to contact.

Der Verlauf der retrace-Kurven kann prinzipiell ebenso Aufschluss über das mechanische Verhalten der Partikel geben. Beim Hochfahren des Cantileverhalters ist zunächst ein enormer Kraftabfall bis hin zu negativen Werten (ca. -140 nN für AFM1, -108 nN für AFM2) zu beobachten, was auf starke adhäsive Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der Trägeroberfläche bzw. dem dort befindlichen Kapselmateriale schließen lässt. So geht das weitere Herauffahren der Messspitze mit einem mäßigen, aber kontinuierlichen Kraftanstieg einher, bis die Werte im Bereich geringerer Kraftanstrengung sprunghaft in den positiven Quadranten wechseln. Ab dieser Position ergibt sich für die Retrace-Kurve ein ähnliches Bild wie für den Hinweg, vor dem eigentlichen Kapselkontakt. Auch der Rückweg führt durch die Tensidschicht, allerdings liegt diese nach dem Eindrücken etwas tiefer, da die Kapsel infolge des Kompressionsvorgangs an Höhe eingebüßt hat. Das bedeutet, dass die Tensidschicht während des Experiments erhalten bleibt und sich in gewisser Hinsicht elastisch verhält. Hierbei wird angenommen, dass die zuvor beiseite gedrückten Tensidmoleküle beim Hochfahren erneut mit der Spitze in Wechselwirkung treten und in Anschluss daran einen Film ausbilden, der dem Ursprünglichen gleicht.¹⁴⁵

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion der Präparation perfluorodecalingefüllter PLGA-Nanokapseln (mittels Ouzomethode)

Die Ergebnisse dieser Messungen sind auf ganz ähnliche Weise interpretierbar. Beide Partikel sind vor dem Eindrücken ungefähr gleich groß, mit einem Größenprofil von 60 nm bis 65 nm in der Höhe und ca. 200 nm in der Breite, wie der Cross-Section in den Abbildungen 4.10 und 4.11 entnommen werden kann. Der Partikelumriss ist nahezu rund, allerdings weisen die Oberflächen, im Gegensatz zu den Beispielen der ersten Synthesestrategie, erkennbare Unregelmäßigkeiten in ihrer Struktur auf. Nach dem Experiment ergibt sich eine Vertiefung im mittleren Partikelbereich, die aber im Vergleich zum bereits bekannten Einkerbungsmuster deutlich breiter ausfällt. Dies spiegelt sich auch im Profil der Cross-Section wider. Die Spitze hinterlässt nach dem Hochfahren eine deutlich tiefere, bis zum Partikelgrund reichende und breitere Öffnung. Beide Partikel verlieren nach der Kompression insgesamt an Höhe und zeigen eine Verbreiterung von ungefähr 50 nm .

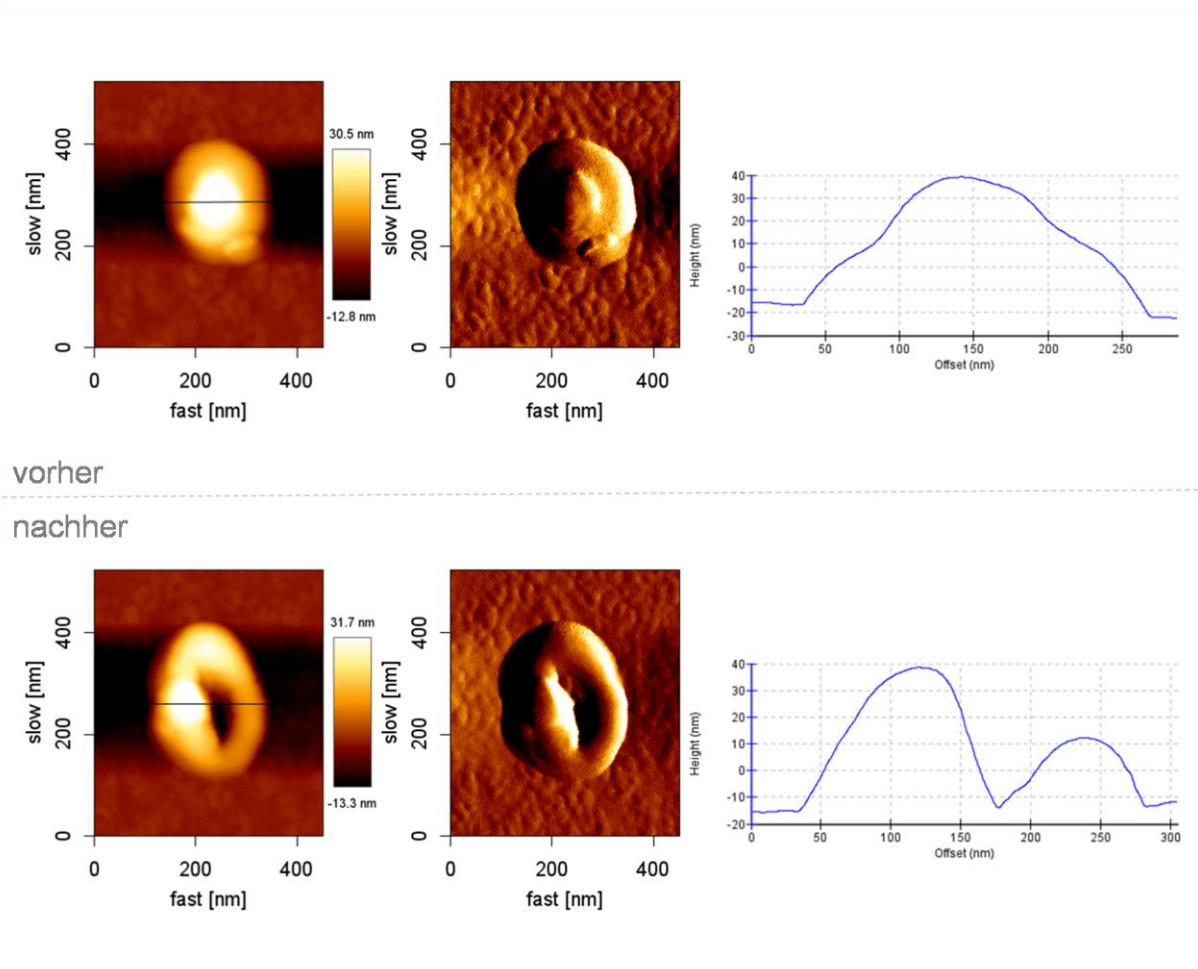


Abbildung 4.10: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk(O)}_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

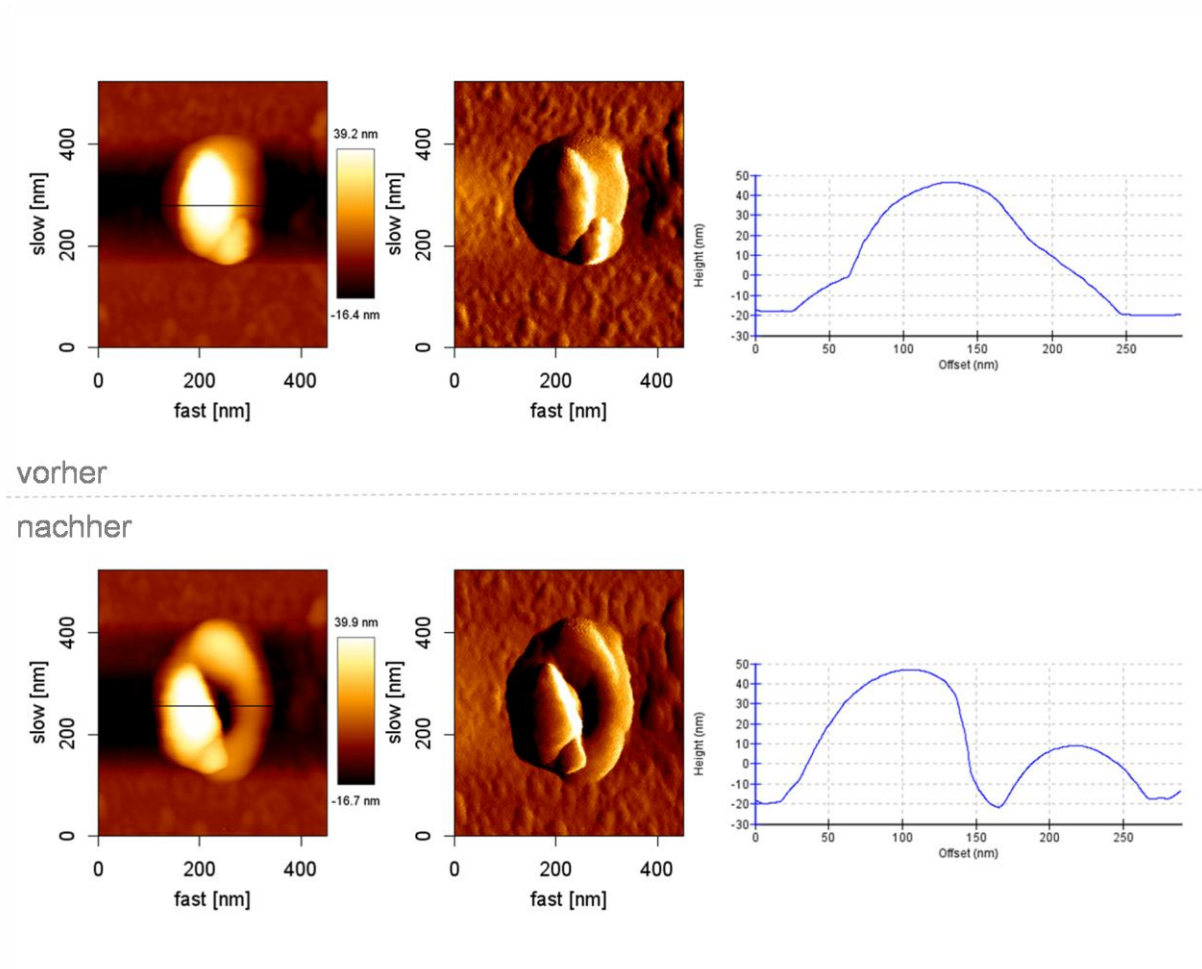


Abbildung 4.11: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk(O)}_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

Die Auftragungen der Kraft gegen die Spitzenposition ergeben ein ähnliches Bild wie zuvor. Zunächst muss die AFM-Spitze die aufliegende Tensidschicht durchdringen, bevor sie durch den jump to contact auf die Partikeloberfläche „gezogen“ wird. Der sich daran anschließende steile Anstieg der trace-Kurven charakterisiert die Resistenz der Partikelwand gegen die Kompressionskraft, gefolgt von einem Abschnitt mit geringerer Steigung. Der nahezu vollständige Durchstoß der Spitze durch die Partikel kann anhand des fast vertikalen Kraftverlaufs der beiden trace-Kurven im unteren Höhenbereich in Abbildung 4.12 bestätigt werden und ist mit einem Auftreffen der Spitze auf eine härtere Oberfläche zu vereinbaren. In Übereinstimmung mit den korrespondierenden Abbildungen der Cross-Section ist in diesem Fall kein semielastisches Verhalten der Partikel bzw. des Partikelmaterials zu beobachten. Nach dem Verlassen der AFM-Spitze bleibt die entsprechende Vertiefung erhalten. Der Grund dafür könnte in der Wahl des Wandmaterials, sprich des Polymers liegen. Der Verlauf der retrace-Kurven verhält sich analog zu den Beobachtungen der vorangegangenen AFM-Messungen. Beim Herauffahren der Spitze fällt die Kraft infolge adhäsiver Wechselwirkungen bis auf negative Werte ab, steigt im weiteren Verlauf allmählich an und wechselt beim Überwinden der Tensidschicht in den positiven Wertebereich. Auch hier hat sich ihre Position ent-

sprechend der geringeren Kapselhöhe nach der Kompression verschoben. Sie reagiert aber weitestgehend elastisch auf die Deformation.

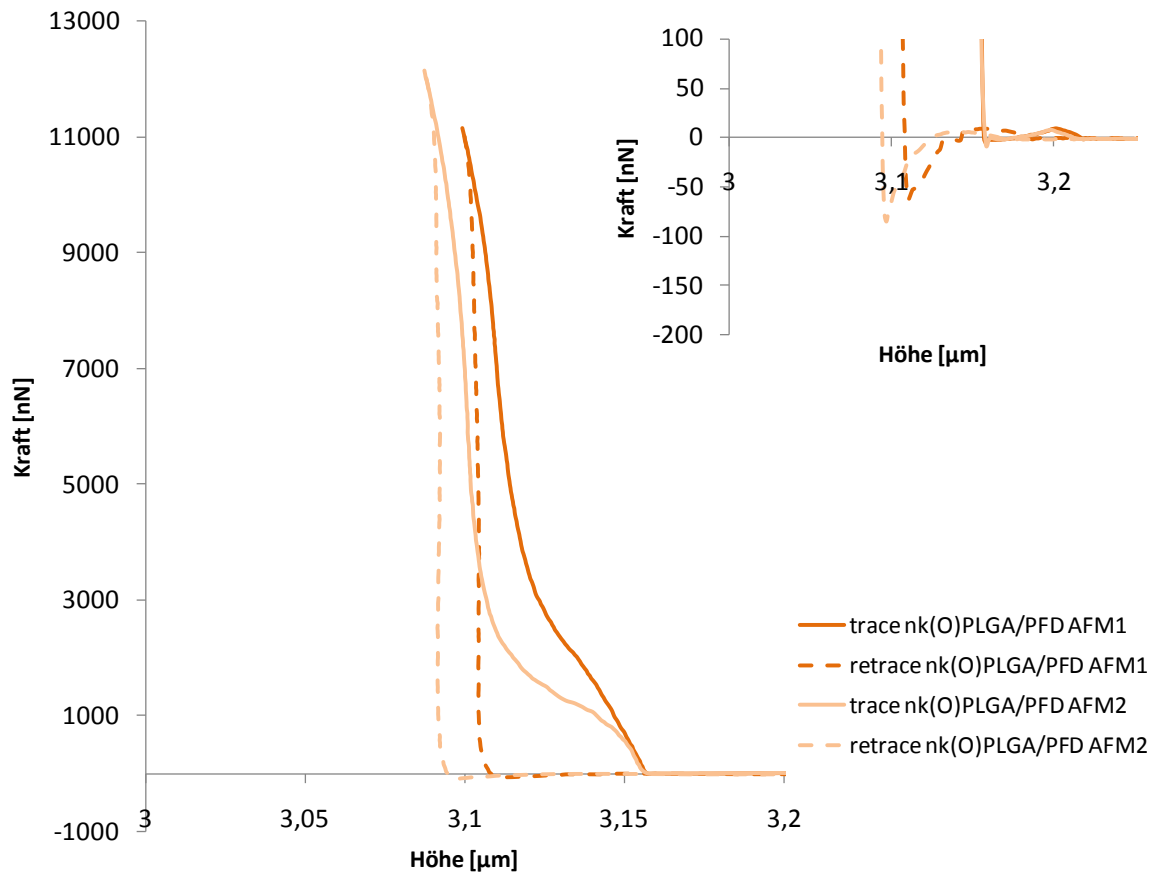


Abbildung 4.12: Kraft-Weg-Diagramm aus den Einkerbungsexperimenten an der Probe $\text{nk(O)}_{\text{PLGA/PFD}}$. Oben rechts: Vergrößerung des Kurvenverlaufs im Bereich des jump to contact.

4.2.3 Ergebnisse und Diskussion der Präparation miglyolgefüllter PBCA-Nanokapseln (mittels anionischer Grenzflächenpolymerisation)

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Particle Tracking-Messungen zeigen auch die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen, dass mit der gewählten Präparationstechnik unter Verwendung des Öls Miglyol die kleinsten Partikel erhalten werden. So weist Partikel 1 ein Größenprofil von ungefähr 22 nm in der Höhe und 60 nm in der Breite, Partikel 2 eine Höhe von rund 45 nm und eine Breite von ca. 110 nm auf. Während die Oberfläche von Partikel 1 einer starken Krümmung unterliegt, ist sie bei Partikel 2 eher abgeflacht.

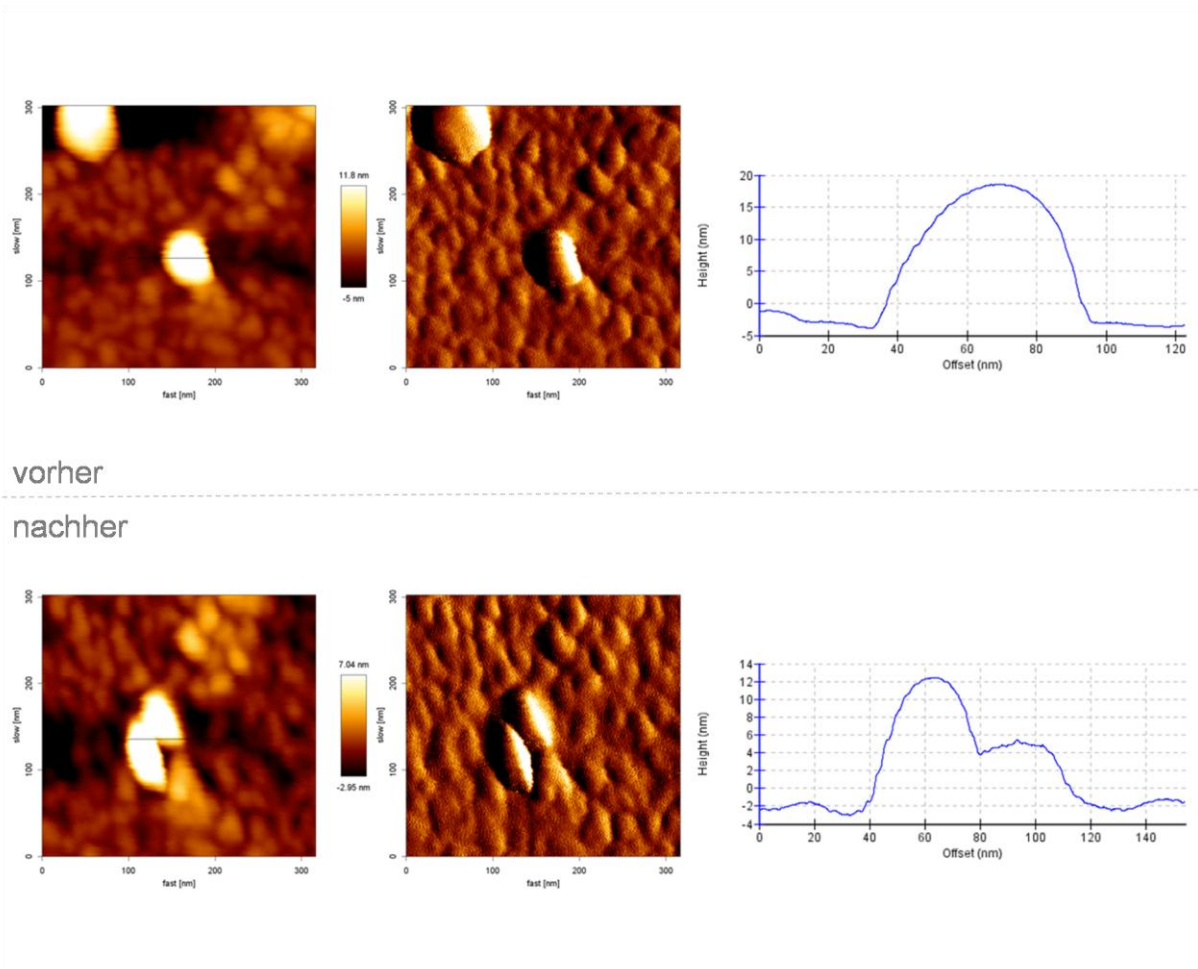


Abbildung 4.13: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk(RS)}_{\text{PBCA/Miglyol}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhentprofil (Cross-Section).

Nach dem Einkerbungsexperiment liefert Partikel 1 in der Nachher-Aufnahme ein geradezu mustergültiges Faltungsmotiv für die Überprüfung der Kapselcharakteristik, vergleichbar mit einem in sich zusammen gesunkenen Ball nach Verminderung seines inneren Luftdrucks. Die maximale Partikelhöhe verringert sich um knapp 8 nm , die Breite beträgt nach dem Eindrücken ca. 80 nm . Die Nachher-Aufnahme des zweiten Partikels zeigt lediglich eine Art Kerbe, die über die obere Partikelmitte verläuft und kann typisch für eine suboptimale Kontaktposition der Spitze auf der Partikeloberfläche sein. Veränderungen der maximalen Partikelhöhe sowie -breite sind kaum wahrzunehmen.

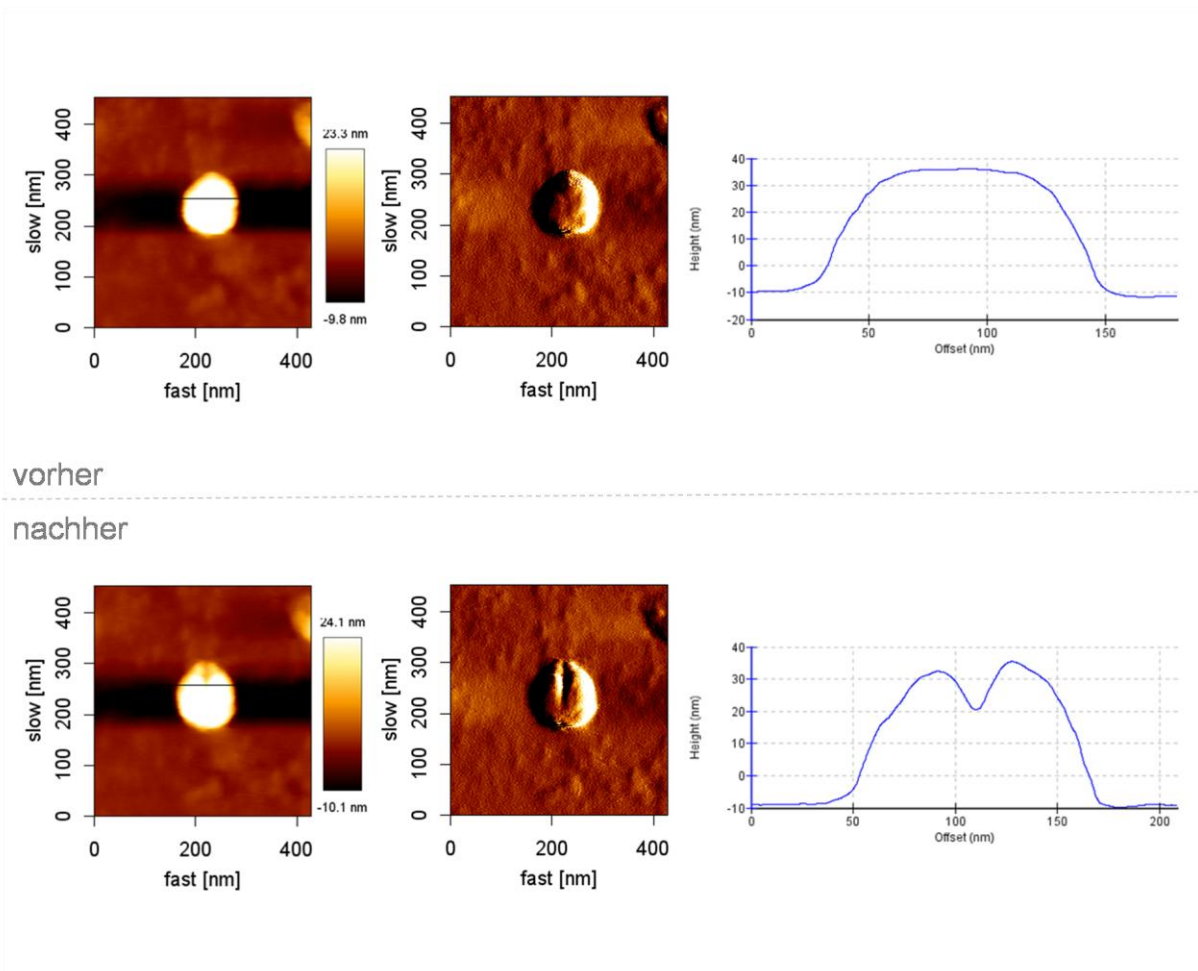


Abbildung 4.14: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk(RS)}_{\text{PBCA/Miglyol}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

Aus der Analyse der korrespondierenden Kraftkurven lässt sich ein ähnliches Kompressionsverhalten zu den Proben der vorausgegangenen Synthesestrategien erkennen und gleichfalls interpretieren (vgl. Abbildung 4.15). Anhand des vertikalen Kraftanstiegs bei geringer Spitzenhöhe ist ein vollständiger Durchstoß der AFM-Spitze durch beide Partikel anzunehmen. Wie im Fall der perfluorodecalingefüllten PBCA-Nanokapseln ($\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$) scheint es, dass die Partikel auch hier mit einem partiellen Wiederverschließen der Struktur nach bzw. während des Entfernens der Spitze antworten (vgl. Cross-Section).

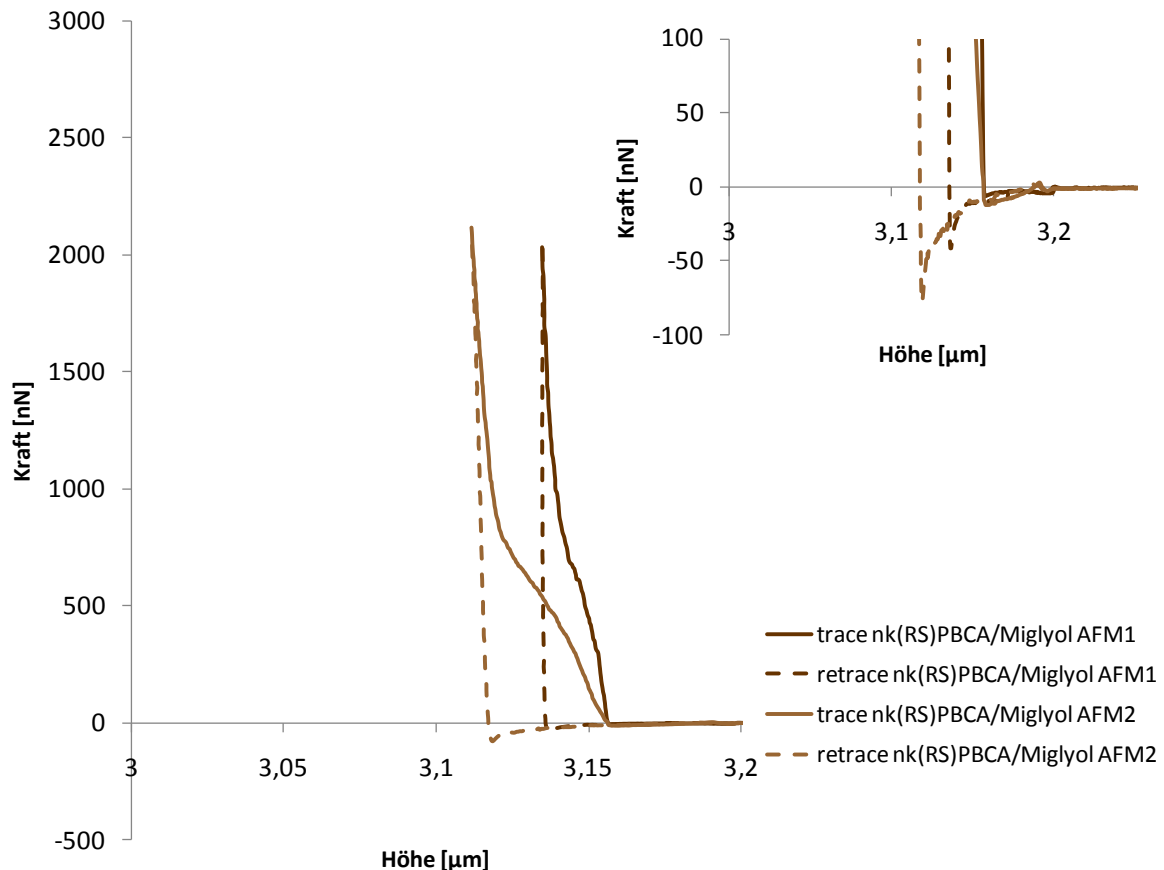


Abbildung 4.15: Kraft-Weg-Diagramm aus den Einkerbungsexperimenten an der Probe $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/Miglyol}}$. Oben rechts: Vergrößerung des Kurvenverlaufs im Bereich des jump to contact.

4.2.4 Ergebnisse und Diskussion der Präparation perfluorodecalingefüllter PLGA-Nanokapseln (mittels Lösemittelverdampfung)

Die Ergebnisse der AFM-Messungen dieser Proben weichen von den bisherigen insofern ab, als dass mittels der rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen fast ausschließlich Partikel mit einem durchschnittlichen Größenprofil von ca. $1 \mu\text{m}$ in der Höhe und $2,5 \mu\text{m}$ in der Breite abgebildet werden. Dieser Befund scheint sich zu den Ergebnissen der Particle Tracking-Messungen widersprüchlich zu verhalten. Es ist aber zu vermuten, dass sich auf dem Träger der AFM-Probe in Anbetracht der Instabilität der hergestellten Dispersionen überwiegend Partikel der sedimentierten Phase abgeschieden haben, welche mittels Particle Tracking nicht gemessen und daher in den Größenverteilungen nicht berücksichtigt werden konnten. Für das AFM verhält sich dieser Umstand wohl genau umgekehrt. Es wäre denkbar, dass die kleineren bzw. kleinsten Partikel beim Waschprozess während der Probenvorbereitung vom Träger entfernt wurden. Somit wären die aus den AFM-Untersuchungen erhaltenen Partikelgrößeninformationen als Ergänzung zu den Ergebnissen der PT-Messungen anzusehen.

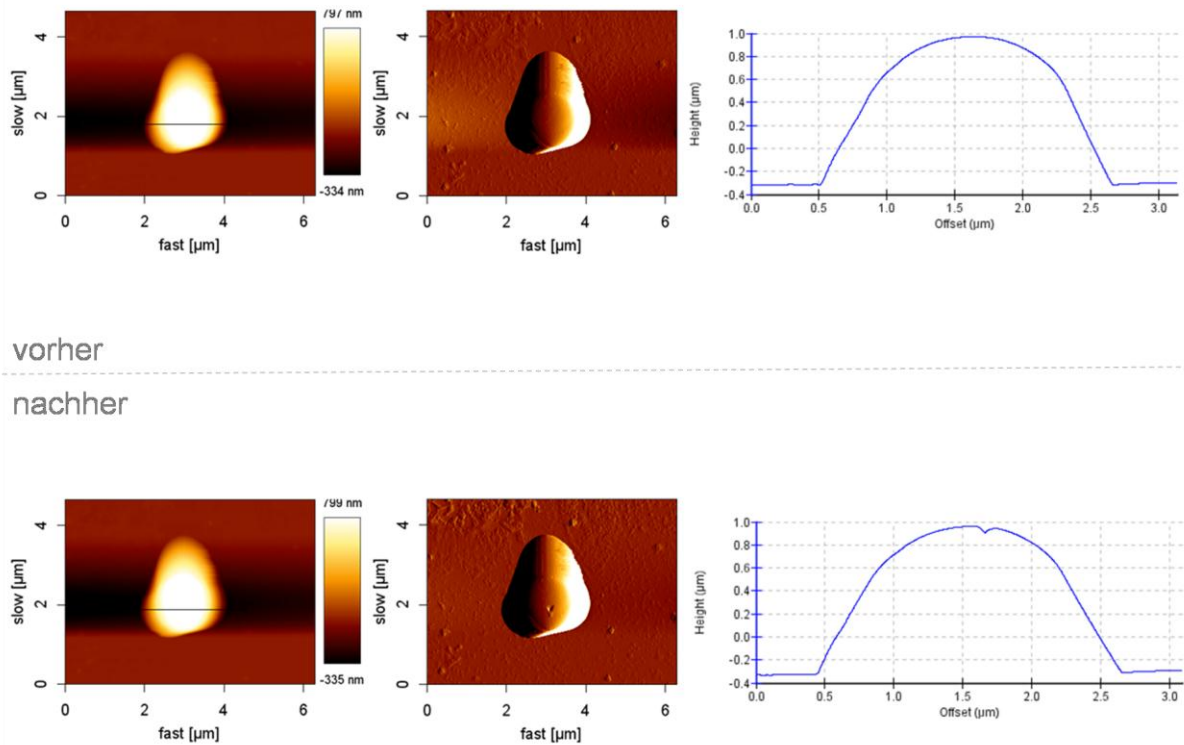
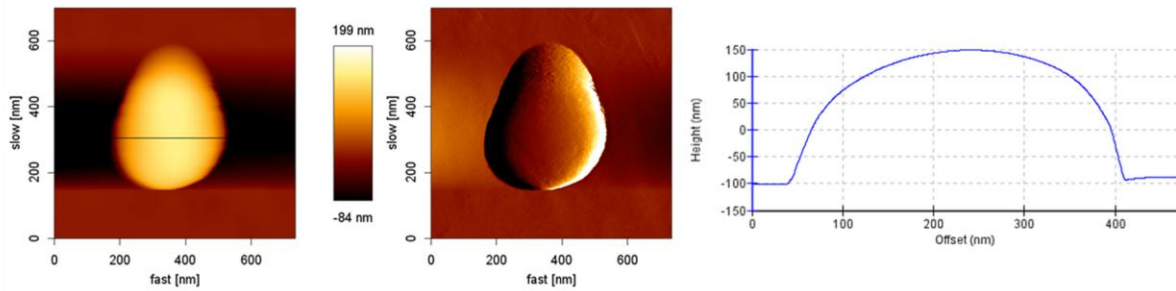


Abbildung 4.16: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk(LV)}_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

Vor der Einkerbung weist Partikel 1 eine Höhe von rund $1,3 \mu\text{m}$ und eine Breite von ungefähr $2 \mu\text{m}$ auf und erreicht damit die Dimension eines Mikropartikels. Aufgrund der immensen Höhendifferenz vermag die AFM-Sonde die Struktur in der Height- und Error-Aufnahme nicht mehr deutlich aufzulösen, mit Hilfe der Cross-Section des Höhenprofils ergibt sich jedoch mit einem Größenverhältnis von ungefähr 1 zu 1,5 eine recht sphärische Partikelgestalt mit gewölbter Kontur. Nach der Kompression hinterlässt die Spitze lediglich einen Abdruck in der Oberfläche. Aufgrund der Größe des Mikropartikels ergeben sich keine Auswirkungen auf die Partikelform in Sinne von Deformationen bzw. einer Faltung. Eine Höhenänderung und/oder eine Partikelverbreiterung werden nicht beobachtet. Wahrscheinlich ist die Spitze zu klein und wird zudem nicht tief genug herabgesenkt, um ein Einkerbungsmuster und die entsprechenden Effekte zu bewirken.



vorher

nachher

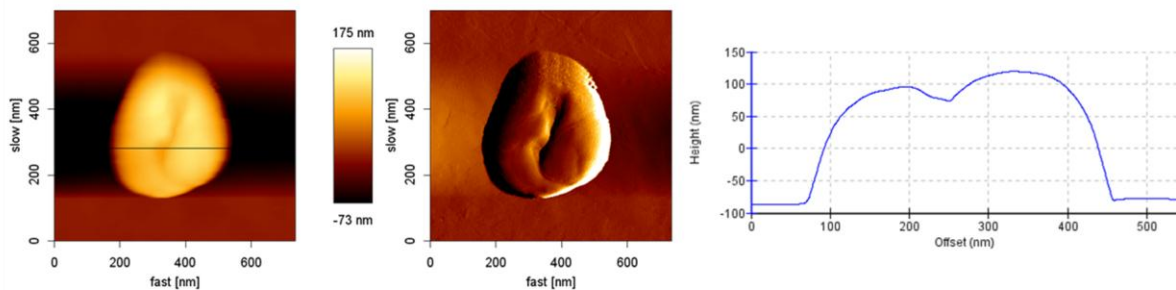


Abbildung 4.17: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk(LV)}_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

Bei Partikel 2 handelt es sich um eines der wenigen kleineren Partikel, die detektiert werden konnten. Mit einer primären Größe von gut 250 nm in der Höhe und ungefähr 350 nm in der Breite führt das Einkerbungsexperiment in diesem Fall wieder zu einer Partikeloptik mit faltungsähnlicher Musterung. Entsprechend kann eine deutliche Reduzierung der Partikelhöhe auf einen maximalen Wert von ca. 210 nm sowie eine geringfügige Verbreiterung um 10 nm bis 20 nm verzeichnet werden.

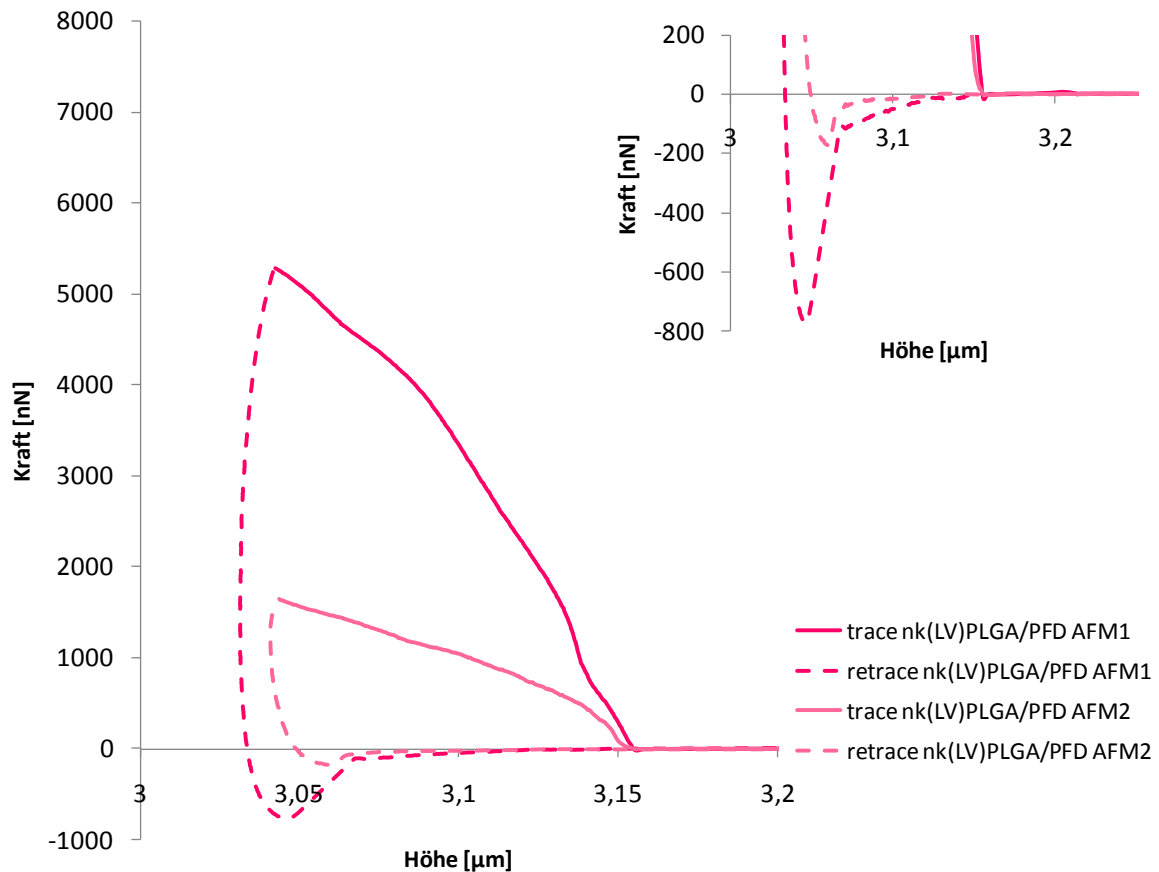


Abbildung 4.18: Kraft-Weg-Diagramm aus den Einkerbungsexperimenten an der Probe $\text{nk(LV)}_{\text{PLGA/PFD}}$. Oben rechts: Vergrößerung des Kurvenverlaufs im Bereich des jump to contact.

Die Kraftkurven zeigen ein zutreffendes Bild. Die trace-Kurve des ersten Partikels lässt keinen prägnanten Steigungseinbruch erkennen und ist auch sonst nicht in die weiteren Abschnitte (Kern, Partikelboden/Trägeroberfläche) zu unterteilen; die Kraft steigt kontinuierlich mit dem Herabsenken der Spitze an. Die mäßige Kurvensteigung bestätigt, dass die Partikelwand nicht inkompressibel ist, aber, wie bereits diskutiert, reicht die Distanz, um die die Spitze herabgesenkt wird, nicht aus, um tiefer in das Partikel einzudringen. Die Eindringtiefe, abzulesen aus der Differenz der Positionen der Spitze bei Partikelkontakt und am Kurvenende, beträgt gerade mal um die 100 nm – im Verhältnis zur Partikelgröße äußerst gering. Bei der trace-Kurve der zweiten Messung ist eine notwendige Steigungsänderung schon eher auszumachen. Ab einer Spitzenhöhe von ca. $3,147 \mu\text{m}$ bricht die Steigung ab und der Anstieg in der Kraft verläuft flacher. Aber auch in diesem Fall nimmt die Kraft am Ende keinen vertikalen Kurvenverlauf an. Die Spitze durchdringt das Partikel nicht vollständig.

Zusammenfassend erscheint es anhand der bisher erhaltenen Ergebnisse grundsätzlich möglich, den charakteristischen Aufbau einer Nanokapsel mit flüssigem Kern auf Grundlage rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen nachzuweisen. Unter zur Hilfenahme der aus

den spektroskopischen Messungen erhaltenen Kraftkurven können so individuelle Merkmale der Probenreihen und damit der zu Grunde liegenden Synthesestrategie aufgedeckt und bewertet werden. Zum Vergleich sind dazu alle Kraftkurven im nachfolgenden Diagramm (siehe Abbildung 4.19) nochmals aufgeführt. Prinzipiell ist es, unter Berücksichtigung der individuellen und nicht gänzlich auszuwertenden Ergebnisse der letzten Synthesestrategie, mit allen Präparationstechniken gelungen, Nanokapseln herzustellen. Schlussendlich zeigen dabei die Messungen der Partikel der ersten Synthesestrategie die repräsentativsten Ergebnisse. Die Partikel sind von sphärischer Gestalt und in vergleichbarer Größe (re)produzierbar. Durch das Einkerbungsexperiment ergibt sich eine kapseltypische Faltung in der Partikelstruktur, wobei das Kapselmaterial in gewisser Hinsicht elastisch auf den „Zerstörungsakt“ reagiert, indem sich die Partikel teilweise wieder verschließen, nachdem oder während die Spitze hinaufgezogen wird. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist vermutlich in der Beschaffenheit der Kapselwand, also in dem verarbeiteten Polymer zu suchen. Im Fall der Einkerbung der entsprechenden Partikel aus PLGA kann dieser Vorgang nicht beobachtet werden – die Spitze hinterlässt eine breite und tiefe Öffnung in der Partikelstruktur. Etwaige Begründungsversuche lassen sich aber nur rein spekulativ formulieren: Denkbar wäre zum Beispiel, dass sich die Polymerketten des Polybutylcyanoacrylats durch die Belastung der Spitze derart auftrennen oder auseinandergedrückt werden, dass ein erneutes Arrangement ihrer Bruchstücke bzw. Kettenenden unter bestimmten Bedingungen möglich ist. Vorstellbar wäre aber auch, dass zumindest das Polymergerüst des unteren Partikelbereichs oder auch weiter innenliegende Polymerketten so elastisch auf die Deformation reagieren, dass sie sich zwar extrem dehnen und im Kontaktpunkt mit der Spitze hinuntergezogen werden, die Zugspannung für diese Distanz jedoch nicht ausreicht, um die Ketten auseinanderzureißen, so dass sie im Anschluss ihre ursprüngliche Ordnung zurückerlangen. Übertragen auf die angestrebte Rolle eines Blutersatzes respektive Sauerstoffträgers könnte dieses bestimmte Maß an Flexibilität der Polymermembran einen Vorteil bedeuten, vergleicht man sie mit der notwendigen Fähigkeit roter Blutkörperchen auf Veränderungen von biologischen Bedingungen, wie beispielsweise verengte Transportwege, mit morphologischer Anpassung zu antworten. In diesem Sinne kann auch ein relativer Vergleich der Anfangssteigungen der Kraftkurven zu Rate gezogen werden, um erste Einschätzungen zur Festigkeit bzw. zur Härte der Kapselwand vorzunehmen. Hierbei deuten die Kraft-Weg-Kurven mit geringen Anfangssteigungen auf eine verhältnismäßig weiche und komprimierbare oder deformierbare Partikeloberfläche hin. Die niedrigste Anfangskompressionskonstante lässt sich aus den Kraftkurven der Proben der ersten Synthesestrategie ermitteln. In beiden Fällen sind vergleichsweise geringe Kraftanstrengungen über eine Strecke von wenigen Nanometern ($\sim 11\text{ nm}$ und 22 nm für $\text{nk(O)}_{\text{PBCA/PFD}}$ AFM1 bzw. 2) aufzubringen, um die Partikelwand zu durchdringen und zum Kern vorzustoßen. Unter der Annahme einer idealen Kugel – bzw. Kapsel-

geometrie mit gleichmäßiger Schale sowie der Vernachlässigung gravitationsbedingter Verformungen der Partikel durch den Trocknungsprozess können mit Kenntnis der Kapselwandstärke Rückschlüsse über das Kernvolumen bzw. den prozentualen Anteil von Perfluorodecalin am Gesamtvolumen der Kapsel gewonnen werden. Demnach ergäben sich rein rechnerisch für die Partikel der Probe $nk(O)_{PBCA/PFD}$ mit ~ 53 % (Partikel 1) und 18 % (Partikel 2) die größten Kernvolumina aller Probenreihen. Tatsächlich kann dieses Ergebnis durch einen Längenvergleich der sich nach dem Steigungseinbruch anschließenden Kurvenabschnitte, in denen die Spitze den vermeintlichen Kapselkern durchfährt, bekräftigt werden. Für beide Partikel legt die Spitze in Relation zur Kapselgröße in diesem Abschnitt insgesamt die längste Strecke zurück. Eine große Menge an eingeschlossenem Perfluorodecalin ist gleichbedeutend mit einer hohen Kapazität für die Sauerstoff-Aufnahme bzw. für den CO_2 -Rücktransport.

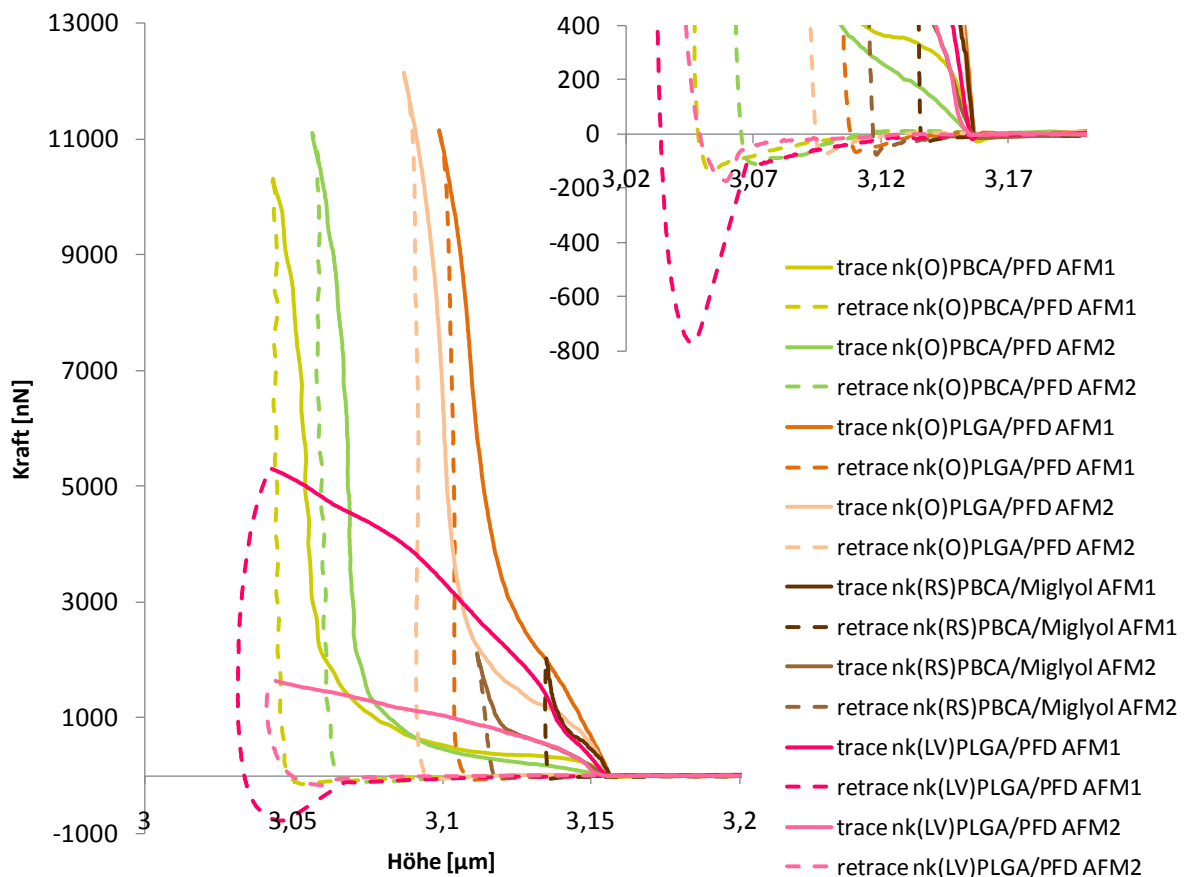


Abbildung 4.19: Vergleich der Kraftkurvenverläufe aller Einkerbungsexperimente an den Proben der Grundsynthesen. Oben rechts: Vergrößerung der Kurvenverläufe im Bereich des jump to contact.

Auf der Grundlage dieser Messungen sowie der entsprechenden Resultate der Particle Tracking-Untersuchungen soll der Fokus von nun an auf der Präparation perfluorodecalingefüllter Nanokapseln mittels des Ouzo-Effekts unter Verwendung von Polybutylcyanacrylat als Kapselwandmaterial liegen. Dazu werden im weiteren Verlauf der Arbeit Optimierungsansätze

gefahren, um ein ideales Verhältnis von Wandstärke und Kernvolumen zu erreichen und physiologisch verwertbare Sauerstoffträger zu erzeugen.

4.3 Ergebnisse und Diskussion der Optimierungsversuche

4.3.1 Optimierung durch Reduzierung der Polymer- und Tensidmenge – Optimierung 1

Aus den Untersuchungen der vier Syntheseansätze hat sich ergeben, dass die Präparation von perfluorodecalingefüllten PBCA-Nanokapseln nach dem Ouzo-Effekt durchaus geeignet erscheint, um auf dieser Basis medizinische Sauerstoffträger herstellen zu können. Auf der Grundlage dieser Synthesestrategie ist es nun zweckmäßig zu testen, inwieweit es möglich ist, die Konzentration an Polymer und Tensid herunterzusetzen ohne die Stabilität und die Funktion der Kapseldispersion zu beeinträchtigen. Dies bietet einerseits den Vorteil, den Verbrauch an potentiell toxischem Material zu reduzieren und damit Kompatibilitäts- und Metabolisierungsprobleme einzudämmen als auch zugleich Herstellkosten zu senken. Andererseits erhofft man sich, infolge des geringeren Monomeranteils dünnere Partikelwände herzustellen, um ihre Permeabilität für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid zu verbessern und ein günstiges Gasaufnahme- und Freisetzungsprofil zu gewährleisten. Dazu wird eine neunteilige Versuchsreihe nach Vorgabe einer 3x3-Matrix gefahren – angefangen mit dem Standard $nk(O^{Opti1}a_{11})_{PBCA/PFD}$ (ursprüngliche Tensid- und Monomerkonzentration) bis $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ (geringste Tensid- und Monomerkonzentration). Die Verminderung der Konzentration erfolgt in jeweils drei Stufen. Detaillierte Angaben über die Konzentrationsverhältnisse sind den Ausführungen in Kapitel 3.4.1 zu entnehmen.

4.3.1.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle Tracking-Messungen der Optimierung 1

Wie zuvor wird die Methode des Particle Tracking angewendet, um auf mögliche Unterschiede in den einzelnen Größenverteilungen der Kapseldispersionen aufmerksam zu werden und gegebenenfalls einen Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der gewählten Tensid-/Monomerkonzentration herzustellen. Zugleich sollen die Untersuchungen Aufschluss über die Stabilität der Kapseldispersionen geben. Pro Probe werden dazu jeweils zwei Messungen durchgeführt. Ihre Nomenklatur folgt nachstehendem Schema:

Probe a_{ij} mit i = Tensidkonzentration und j = Monomerkonzentration

1. Messung $nk(O^{Opti1}a_{ij})_{PBCA/PFD} 1 \text{ PT}$
2. Messung $nk(O^{Opti1}a_{ij})_{PBCA/PFD} 2 \text{ PT}$

Analog zu den Messungen aus Kapitel 4.1 werden die Proben zuvor mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Untersuchungen erfolgen auch hier innerhalb von 24 Stunden nach der Synthese. Generell zeigt sich im Fall der optimierten Proben verstärkt das Problem unzureichender Detektierbarkeit; die Teilchen sind für das Auge sowie für die Kamera extrem schlecht sichtbar, so dass sich für die Größenverteilungen ein verhältnismäßig unscharfes Häufigkeitsprofil ergibt. Für die Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a32}})_{\text{PBCA/PFD}}$ steht aus diesem Grund nur eine Messung für die Auswertung zur Verfügung. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die Einzelergebnisse der insgesamt 17 Messungen. Die korrespondierenden graphischen Darstellungen der Radienverteilungen folgen in den Abbildungen 4.20 bis 4.28.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a}_{ij}})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Optimierung 1

Probe	Verhältnis Monomer/Tensid [%]	Messung	mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
a11	100/100	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a11}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	357 ± 4	177 ± 8
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a11}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	207 ± 1	171 ± 28
a12	50/100	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a12}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	167 ± 6	94 ± 14
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a12}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	202 ± 13	136 ± 32
a13	10/100	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a13}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	301 ± 2	119 ± 4
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a13}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	489 ± 5	270 ± 12
a21	100/50	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a21}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	383 ± 6	191 ± 17
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a21}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	364 ± 9	312 ± 25
a22	50/50	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a22}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	185 ± 2	52 ± 6
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a22}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	199 ± 3	105 ± 9
a23	10/50	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a23}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	154 ± 4	33 ± 5
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a23}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	183 ± 6	79 ± 12
a31	100/20	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a31}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	178 ± 10	117 ± 22
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a31}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	230 ± 7	132 ± 16
a32	50/20	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a32}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	359 ± 9	327 ± 39
a33	10/20	$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}} 1 \text{ PT}$	164 ± 4	80 ± 8
		$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}} 2 \text{ PT}$	175 ± 2	62 ± 5

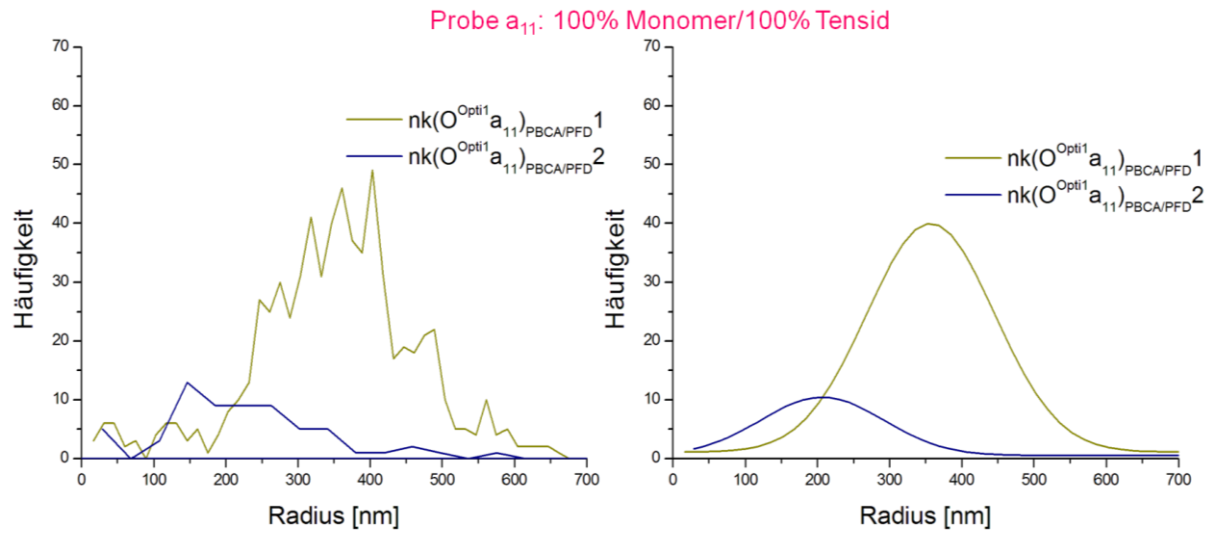


Abbildung 4.20: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1}_{a_{11}})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

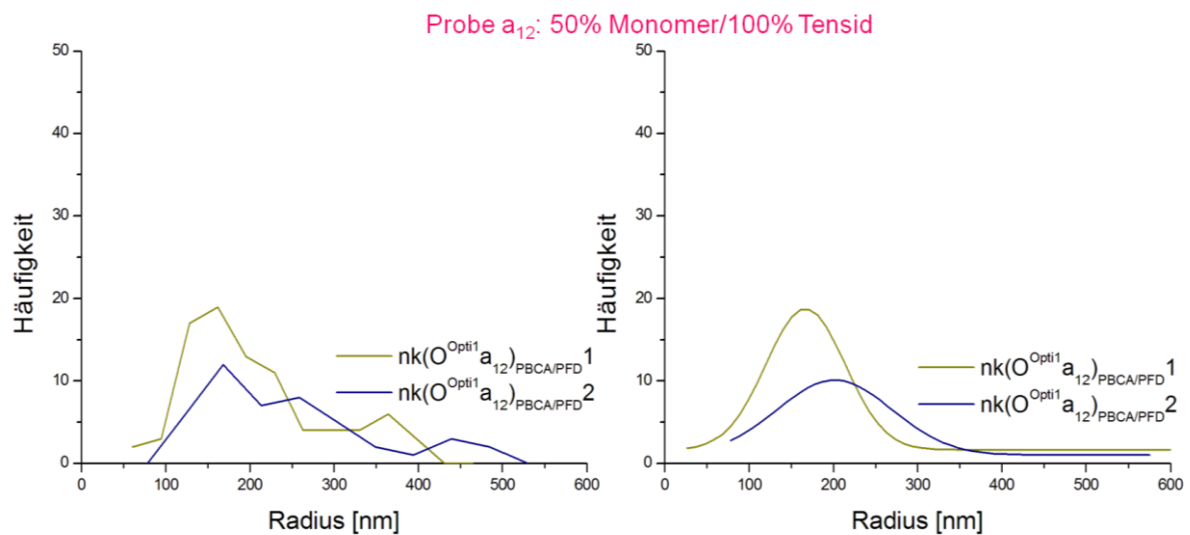


Abbildung 4.21: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1}_{a_{12}})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

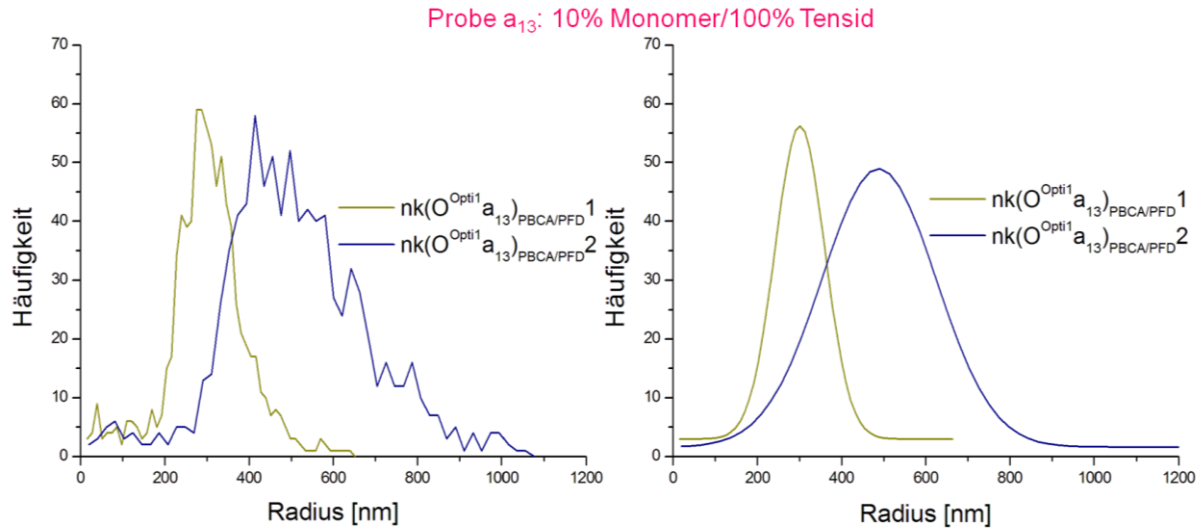


Abbildung 4.22: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1} a_{13})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

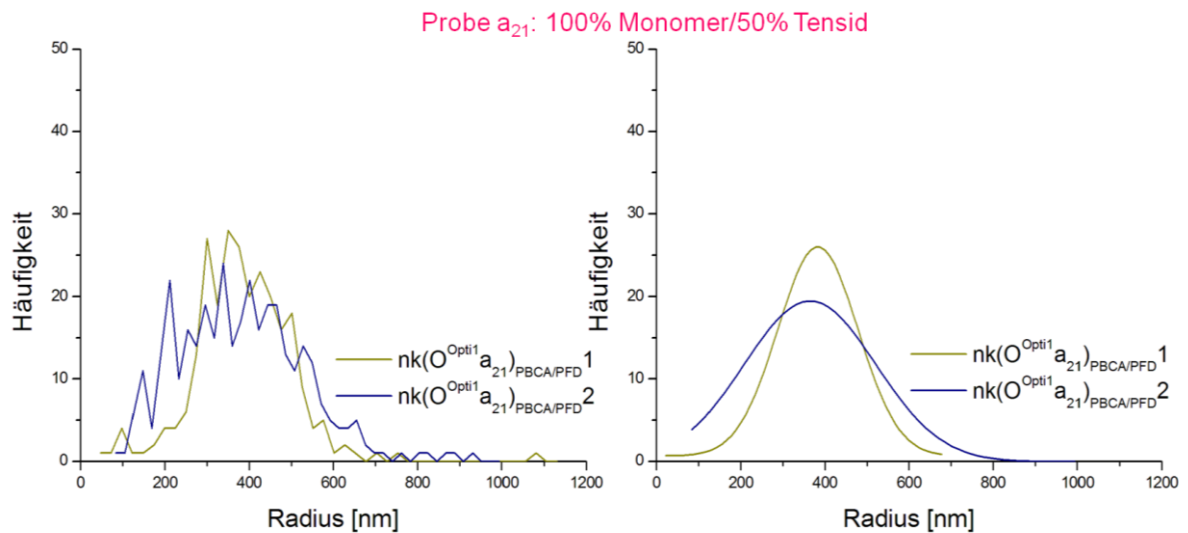


Abbildung 4.23: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1} a_{21})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

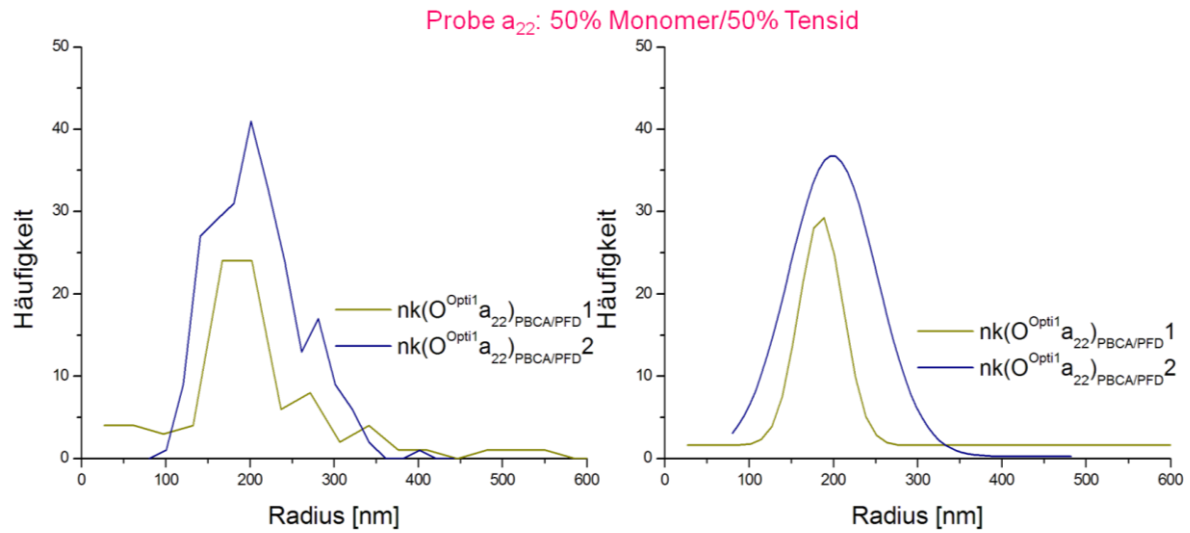


Abbildung 4.24: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1} a_{22})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

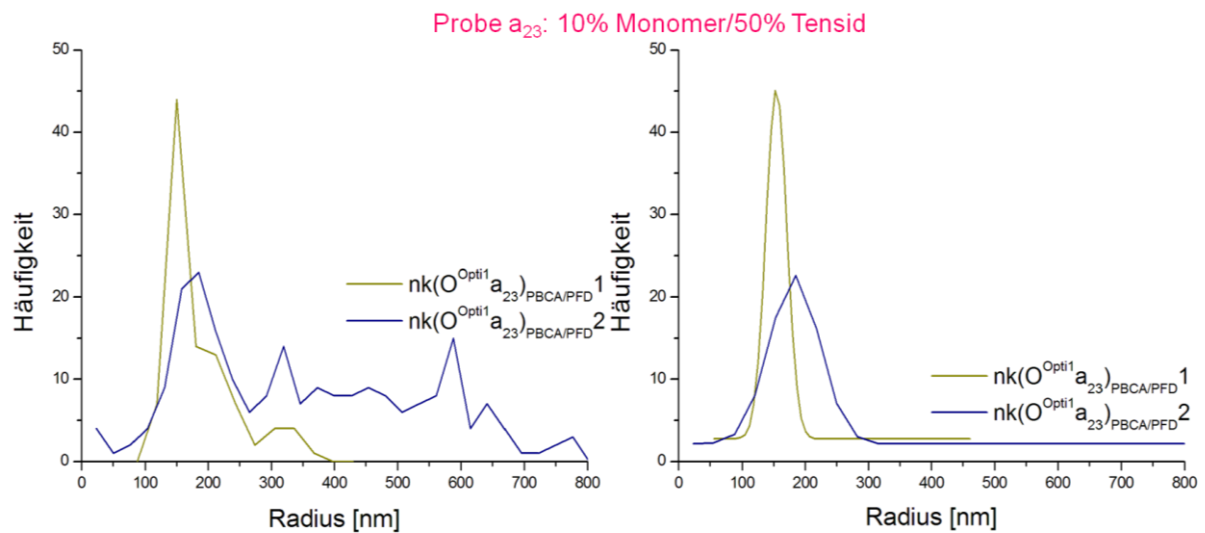


Abbildung 4.25: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1} a_{23})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

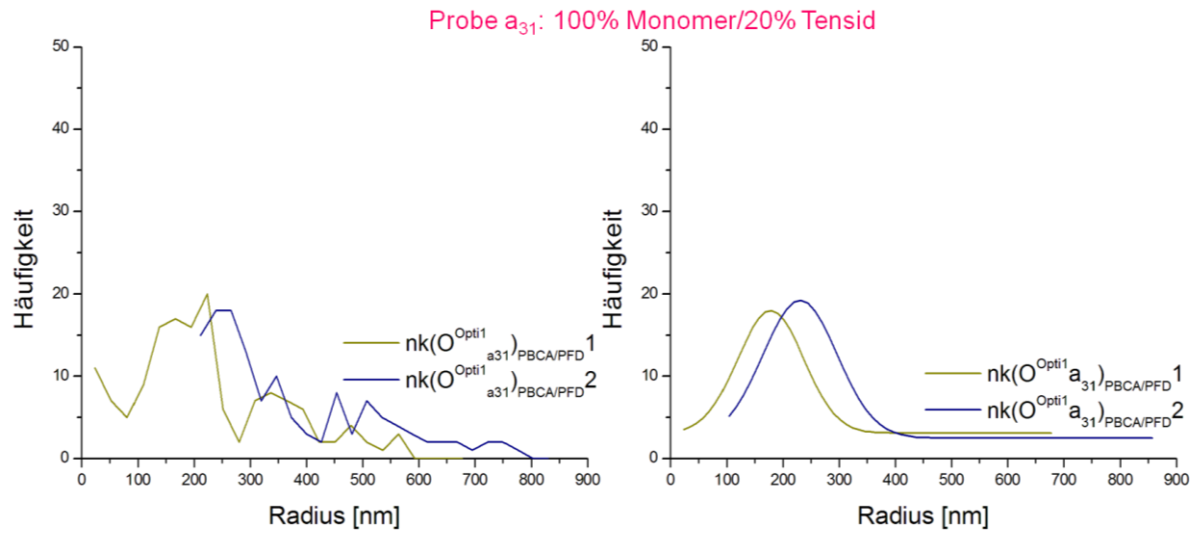


Abbildung 4.26: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1}_{a_{31}})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

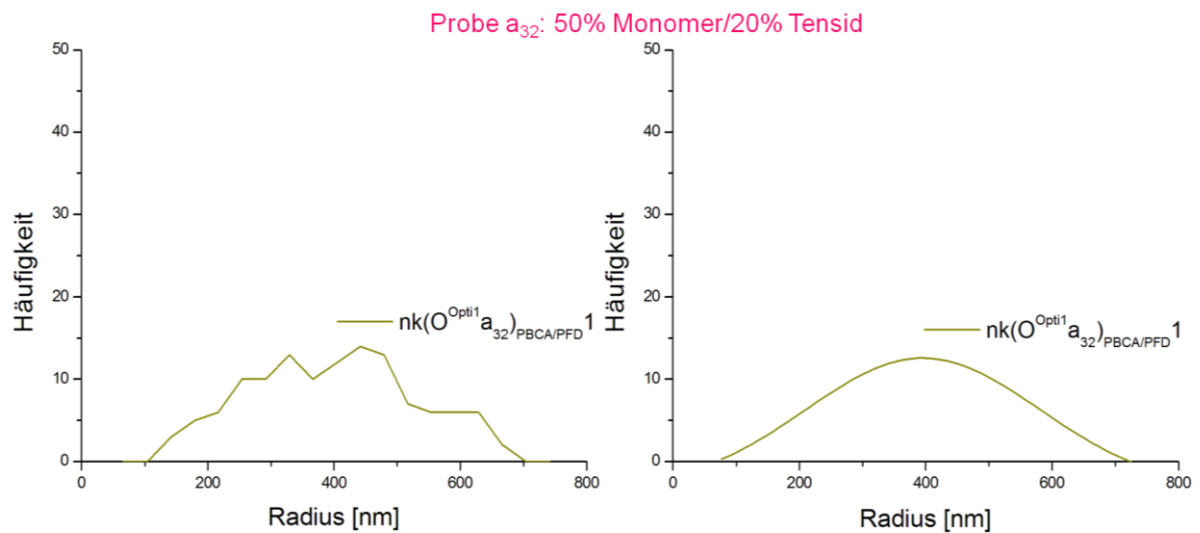


Abbildung 4.27: Links: Größenverteilung der Messung der Probe $nk(O^{Opti1}_{a_{32}})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilung.

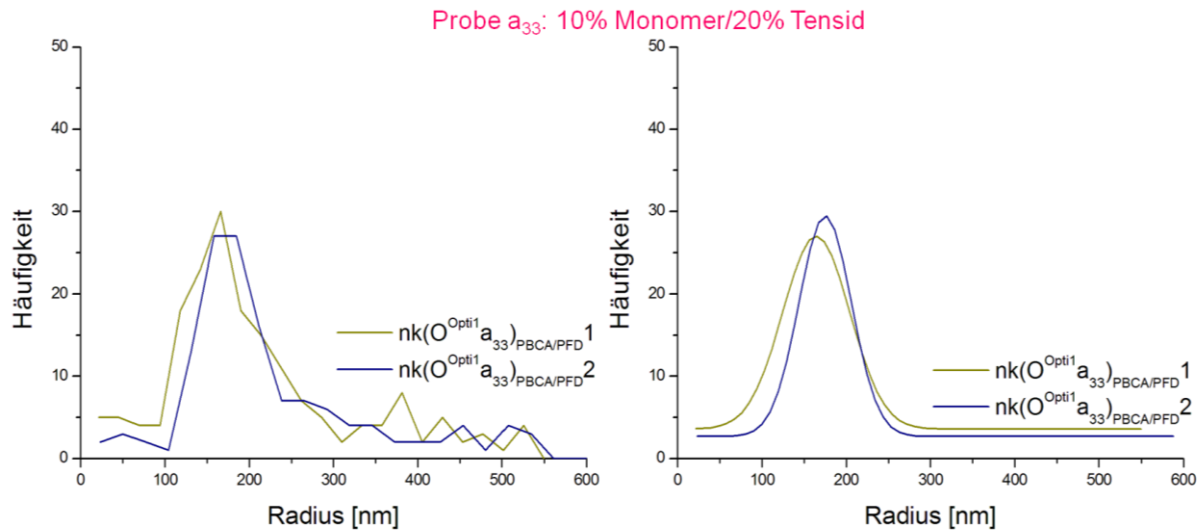


Abbildung 4.28: Links: Größenverteilungen der Messungen der Probe $nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$. Rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

Abgesehen von den geringen Häufigkeitswerten für einige Messungen, aufgrund der erwähnten Detektionsschwierigkeiten, spiegeln die Verteilungen größtenteils reproduzierbare und damit verwertbare Messergebnisse wider. Bemerkenswerte Abweichungen sind zwischen den einzelnen Verteilungen der Proben $nk(O^{Opti1}_{a_{11}})_{PBCA/PFD}$ und $nk(O^{Opti1}_{a_{13}})_{PBCA/PFD}$ festzustellen. Wie den Abbildungen 4.20 sowie 4.22 entnommen werden kann, sind die Größenverteilungen der einzelnen Proben gegeneinander verschoben, wobei Messung 2 der Probe a_{11} so geringe Häufigkeitswerte im Vergleich zu Messung 1 aufweist, dass sie als weniger repräsentativ eingestuft werden kann. Anders verhält es sich bei den Messungen der Probe a_{13} , die in beiden Fällen Verteilungen mit relativ hohen Häufigkeitswerten vorweisen können. Während Messung 2 eine breite Verteilung im oberen Radienbereich ergibt, zeigt Messung 1 eine stärker monodisperse Verteilung mit durchschnittlich kleineren Partikeln. Zu einer Überlappung der Verteilungen kommt es bei Radienwerten zwischen ungefähr 300 nm und 420 nm.

Trägt man die Hauptverteilungsbreiten aller Messungen gegeneinander auf, so fällt auf, dass prinzipiell zwei Zonen auszumachen sind, wobei sich die Partikelgrößen mehrheitlich auf den Radienausschnitt zwischen knapp 100 nm und 350 nm konzentrieren (vgl. Abbildung 4.29: Diagramm der Verteilungsbreiten).

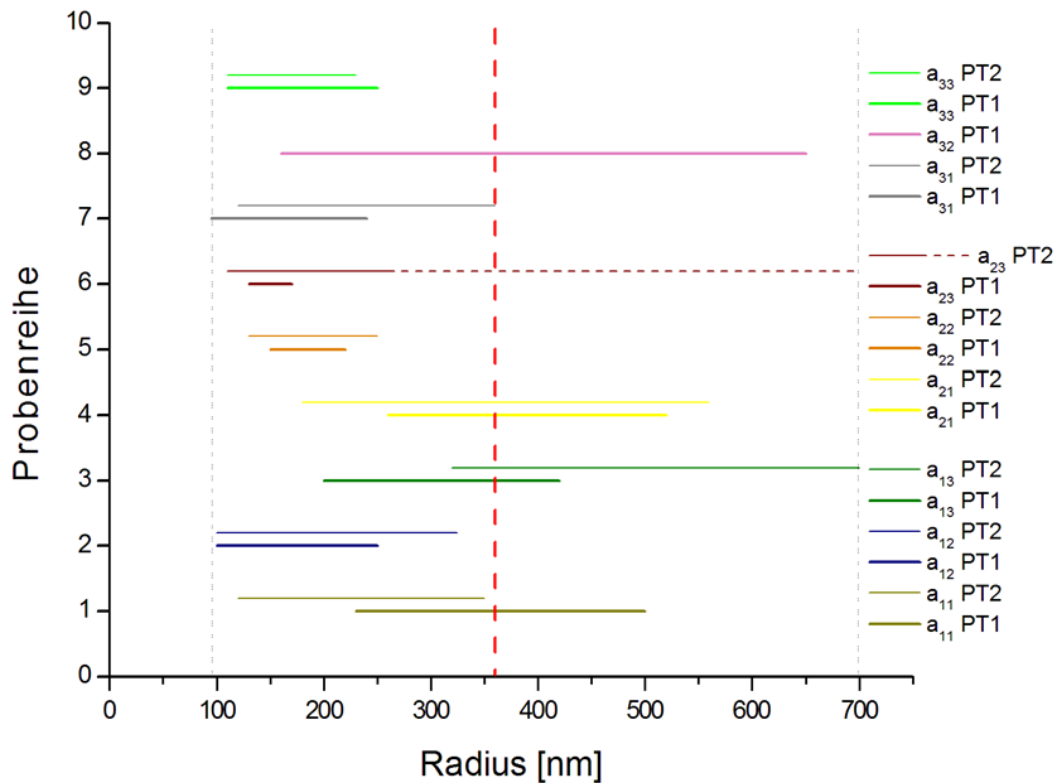


Abbildung 4.29: Auftragung der Hauptverteilungsbreiten aller Messungen der Optimierung 1. Die vertikalen grau gestrichelten Linien begrenzen die Größenbereich insgesamt nach oben und nach unten. Die vertikale rot gestrichelte Linie unterteilt die Verteilungsbreiten in zwei Größenabschnitte. Die horizontale gestrichelte Linie für die Messung $nk(O^{Opti1}_{a_{23}})_{PBCA/PFD}$ kennzeichnet die bimodale Verteilungsform.

Betrachtet man nur die Verteilungsbreiten der repräsentativeren Messungen und vergleicht diese mit den gemessenen Hauptverteilungsbreiten der „Muttersynthese“ aus Kapitel 4.1.1 wird dieser Umstand deutlicher hervorgehoben (siehe Abbildung 4.30). Der Hauptanteil ist in gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Messungen der Muttersynthese $nk(O)_{PBCA/PFD}$ zu bringen, wobei sich die Verteilungen hauptsächlich auf den Bereich von knapp 100 nm bis 250 nm beschränken und damit einen relativ engen und in diesem Sinne monodispersen Größenbereich mit reproduzierbaren Teilchengrößen abstecken. Vereinzelt sind auch Partikel mit Radien zwischen 250 nm und 350 nm zu detektieren, die ebenfalls noch im Gültigkeitsbereich der Ausgangssynthese liegen. Rechtsverschiebungen darüber hinaus sind die Ausnahme und könnten durch Messschwierigkeiten wie zum Beispiel Unschärfen und daraus abzuleitende Fehlkalkulationen begründet werden.

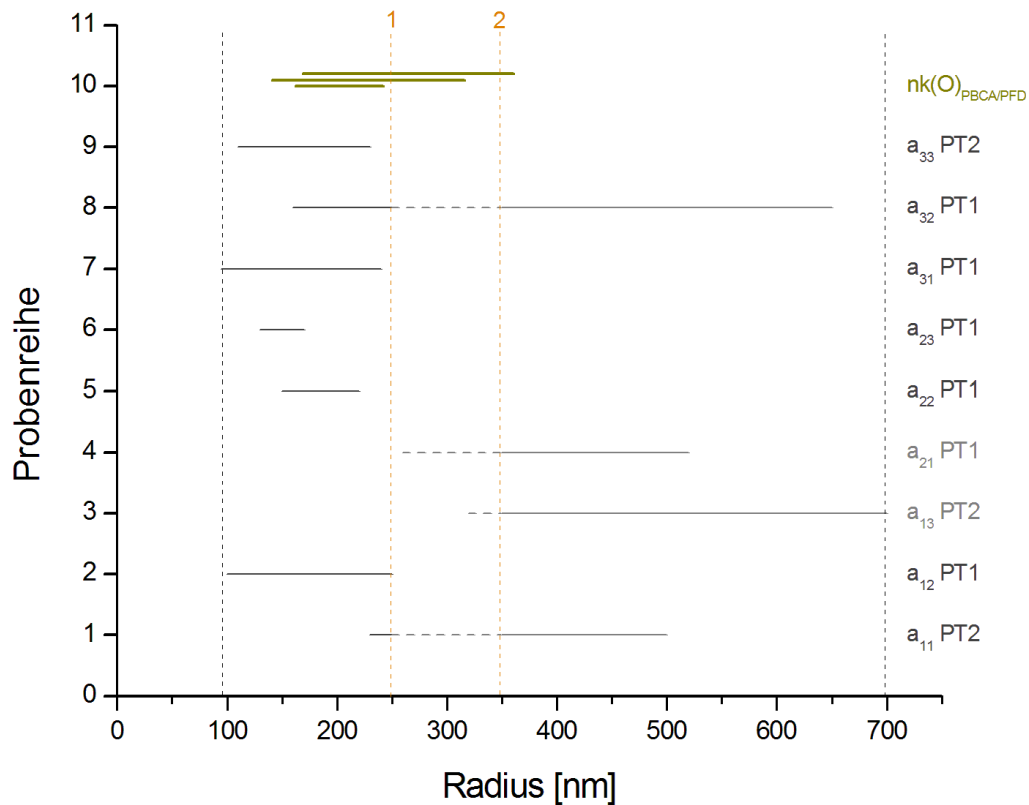


Abbildung 4.30: Auftragung der Hauptverteilungsbreiten der repräsentativen Messungen der Optimierung 1 im Vergleich mit den Hauptverteilungsbreiten der Probenmessungen der Muttersynthese aus Kapitel 4.1.1. Die vertikalen, äußeren schwarz gestrichelten Linien begrenzen den Verteilungsbereich insgesamt. Im Bereich zwischen der unteren Grenze und der vertikalen orange gestrichelten Linie 1 (~ 100 nm bis 250 nm) liegt der Hauptanteil. Zwischen rund 250 nm (Linie 1) und 350 nm (Linie 2) kann eine Art Übergangszone abgesteckt werden, die den oberen Verteilungsbereich der Mutterproben abdeckt. Daran schließt sich ein Bereich an, in dem ausschließlich größere Partikel als in den Proben der Muttersynthese detektiert wurden.

Eine Aufführung der Resultate in Abhängigkeit von der Monomer- respektive Tensidkonzentration lässt hingegen keine eindeutige Tendenz erkennen. In den Abbildungen 4.31 und 4.32 sind dazu die Verteilungen einer Probenreihe gegeneinander aufgetragen.

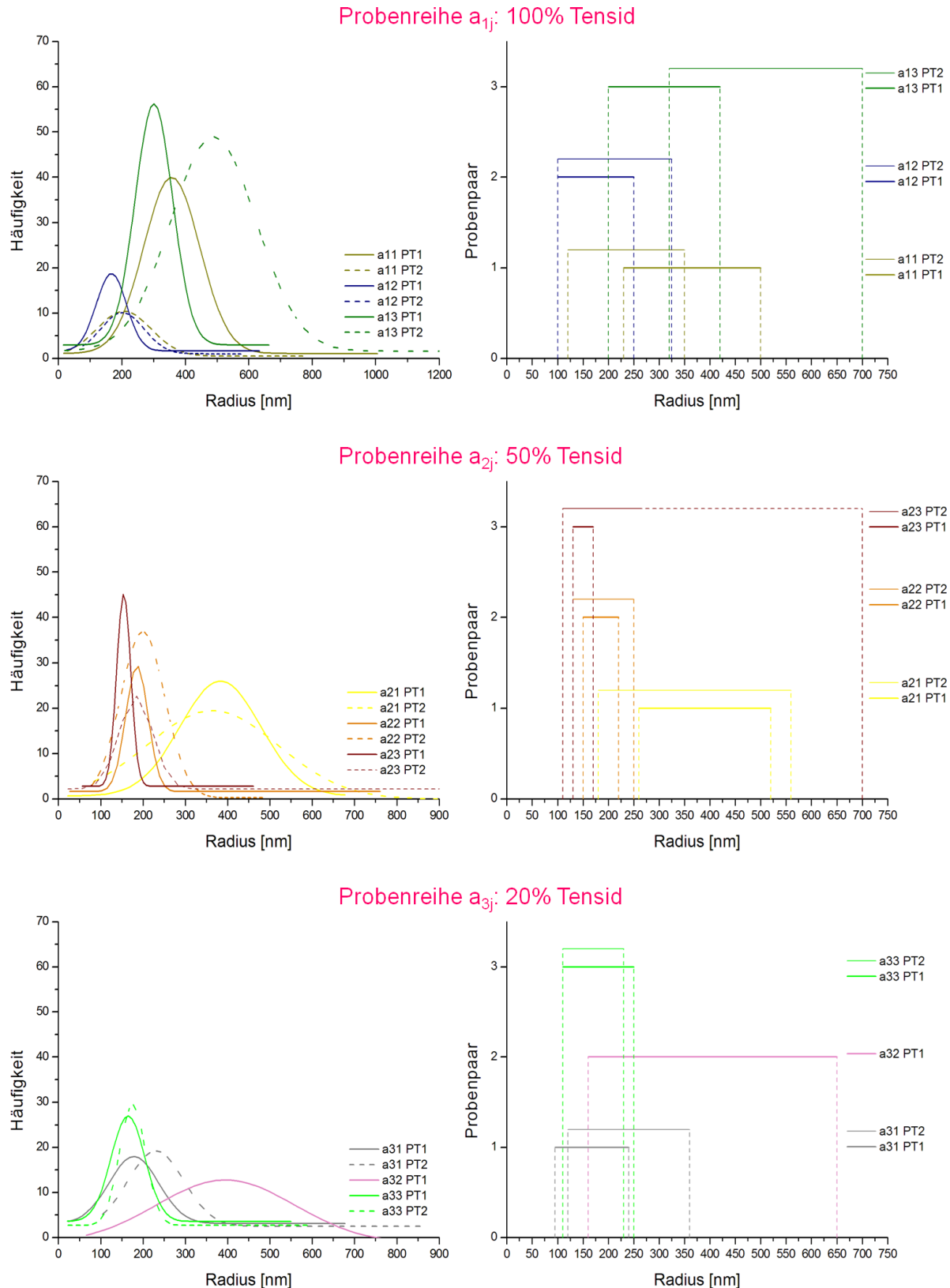
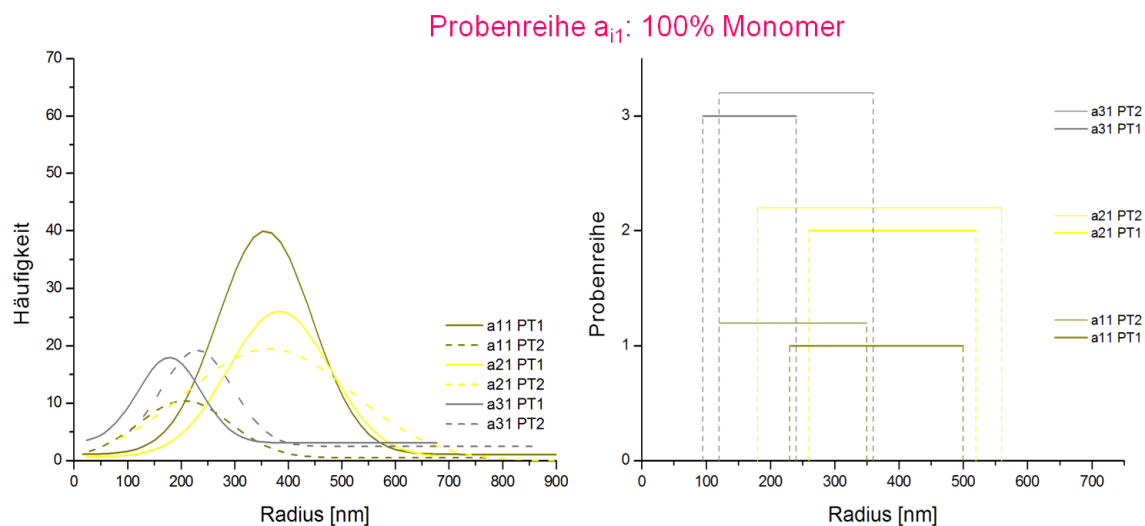


Abbildung 4.31: Gegenüberstellungen der Messergebnisse einer Probenreihe bei konstanter Tensidkonzentration. Links: Normalverteilungen der Probenreihen (oben: Probenreihe a_{1j} mit 100% Tensidgehalt, mitte: Probenreihe a_{2j} mit 50% Tensidanteil, unten: Probenreihe a_{3j} mit 20% Tensidgehalt). Rechts: Korrespondierende Diagramme der Verteilungsbreiten.

Bei einem Tensidgehalt von 100% weiten sich die Verteilungen insgesamt über einen Größenbereich von 100 nm bis 700 nm im Radius aus. Betrachtet man die jeweils repräsentativere Messung der Proben könnte eine Verminderung der Monomerkonzentration von 100% auf 50% eine geringfügige Verringerung der Partikelgröße bewirken. Eine deutlichere Abhängigkeit lässt sich bei den Messungen der Probenreihe mit einem Tensidgehalt von 50% erkennen. Je weniger Monomer eingesetzt wird, umso kleiner werden die Partikel und umso schmaler wird der Verteilungsbereich. Im Gegensatz dazu verändern sich die Verteilungsbreiten bei einer Tensidkonzentration von 20% nicht sonderlich, sieht man von der einzelnen Messung der Probe $nk(O^{Opti1}a_{32})_{PBCA/PFD}$ mit einer recht polydispersen Größenaufteilung ab. Die Verteilungsbreiten der Proben $nk(O^{Opti1}a_{31})_{PBCA/PFD}$ und $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ liegen hingegen im Größenbereich von ~ 95 nm bis 360 nm.

Ebenso inkonsequent lassen sich die Messungen in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration bei konstantem Monomergehalt zusammenfassen. Eine Verringerung der Tensidkonzentration führt nicht zwangsläufig zu einer tendenziellen Veränderung in der Partikelgrößenverteilung. Zudem konnte keine Instabilität der einzelnen Proben als Folge der Reduzierung des Tensidanteils beobachtet werden.



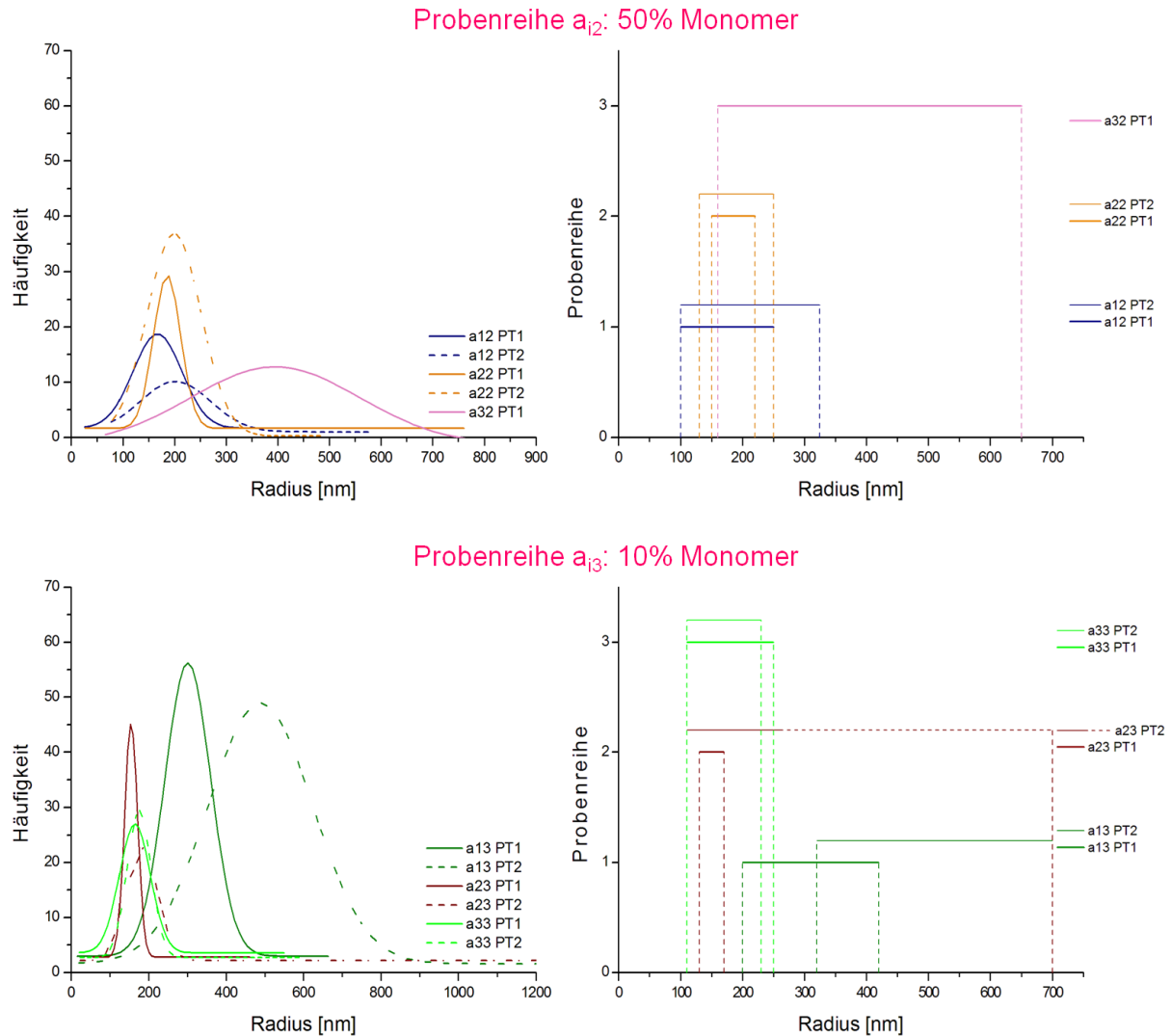


Abbildung 4.32: Gegenüberstellungen der Messergebnisse einer Probenreihe bei konstanter Monomerkonzentration. Links: Normalverteilungen der Probenreihen (oben: Probenreihe a_{i1} mit 100% Monomeranteil, mitte: Probenreihe a_{i2} mit 50% Monomeranteil, unten: Probenreihe a_{i3} mit 10% Monomeranteil). Rechts: Korrespondierende Diagramme der Verteilungsbreiten.

Da eine Veränderung der Tensid- oder Monomerkonzentration weder einen definitiven Einfluss auf die Partikelgröße oder ihre Größenverteilung noch auf die Stabilität der Dispersionen ausübt, scheint die Partikelsynthese den Ergebnissen der PT- Untersuchungen zur Folge mit einer breiten Variationsspanne in den jeweiligen Eduktkonzentrationen möglich zu sein. Dieses Ergebnis entspricht der in der Literatur zum Ouzo-Effekt aufgestellten Behauptung, dass die Tröpfchen- bzw. Partikelgröße lediglich eine Funktion des Öl-zu-Lösemittel-Verhältnisses, sprich des Verhältnisses von Perfluordecalin zum Lösemittelgemisch sei.^{90, 93} Demzufolge ist es möglich den Ansatz der Partikelsynthese im Rahmen der Optimierung 1 auf ein Minimum herabzusetzen, ohne eine Veränderung des charakteristischen Größenparameters herbeizuführen.

Ob sich durch den scale-down-Prozess allerdings Auswirkungen auf den strukturellen Aufbau der Partikel in Hinblick auf das Kern-Schale-Modell einer Nanokapsel ergeben, vermag durch die AFM-Untersuchungen geklärt werden.

4.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der Optimierung 1

Durch die Reduzierung der Monomerkonzentration ist anzunehmen, dass sich um die Perfluorodecalintropfen eine Kapselhülle mit geringerer Wanddicke entwickelt bzw. dass sich bei unzureichender Materialverfügbarkeit ungeplante Unregelmäßigkeiten oder Unebenheiten in der Oberflächenstruktur der Nanopartikel ausbilden. Dies gilt es mit Hilfe der rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen aufzudecken. Dabei könnte eine dünnere Polymerschicht einen gewissen Verlust an Festigkeit und Härte der Partikelwand bedeuten. Daher wären bei den Einkerbungsexperimenten eine geringere Resistenz der Partikel gegen eine Kompression der Kapselwand zu erwarten, was sich beispielsweise in Unterschieden in den Anfangssteigungen der Kraftkurven oder auch in Form einer veränderten elastoplastischen Reaktion, einem abweichenden Faltungsmuster, bemerkbar machen könnte. Um diese Auffälligkeiten festzuhalten, werden wie gewohnt Vorher-Nachher-Aufnahmen von den Partikeln gemacht, je zwei Partikel pro Probe, sowie der Verlauf der Kraft gegen die Spitzenbewegung aus den jeweiligen Einkerbungsexperimenten aufgetragen und analysiert. Dazu werden, wie nach obiger Prozedur erläutert (siehe Kapitel 3.5.2.5), auf Glasträgern aufgetragene verdünnte, eingetrocknete und mit Ethanol abgewaschene Proben verwendet. Die Nomenklatur der Probenmessungen ergibt sich zu:

Probe a_{ij} mit i = Tensidkonzentration und j = Monomerkonzentration

1. Messung $nk(O^{Opti1}_{a_{ij}})_{PBCA/PFD1}$ AFM
2. Messung $nk(O^{Opti1}_{a_{ij}})_{PBCA/PFD2}$ AFM

Zunächst ist festzuhalten, dass alle beobachteten Partikel eine sphärische Gestalt mit glatter Oberfläche aufweisen; es können keine prägnanten Unregelmäßigkeiten mittels der AFM registriert werden. Die Teilchengrößen variieren von ca. 40 nm bis 140 nm in der Höhe und von 150 nm bis 550 nm in der Breite, wobei keine größenspezifische Abhängigkeit von der Eduktkonzentration auffällt. Im direkten Vergleich sind die Partikel der Probenreihe a_{2j} dimensional etwas größer als die Partikel der anderen beiden Probenreihen. Nach dem Einkerbungsexperiment ist nicht bei allen Partikeln das typische Faltungsmuster zu erkennen. Zum Einen ist dies auf Artefakte der Messmethodik (verdoppelte Darstellungen durch eine materialkontaminierte Messspitze) und auf Messungenauigkeiten (suboptimale Spitzenauftreffposition) zurückzuführen, zum Anderen könnte die Ursache dafür natürlich in der bedingten Veränderung der Synthese liegen. Eine definitive Faltung kann bei den Partikeln 1

und 2 der Proben $nk(O^{Opti1}a_{11})_{PBCA/PFD}$, $nk(O^{Opti1}a_{21})_{PBCA/PFD}$, Partikel 2 der Probe $nk(O^{Opti1}a_{23})_{PBCA/PFD}$, Partikel 2 der Probe $nk(O^{Opti1}a_{31})_{PBCA/PFD}$ und den Partikeln 1 und 2 der Probe $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ ausgemacht werden (vgl. Abbildungen 6.13 bis 6.30 im Anhang). Die Oberfläche des Partikels 2 der Probe $nk(O^{Opti1}a_{32})_{PBCA/PFD}$ scheint hingegen nahezu inkompressibel zu sein, es ist lediglich ein leichter Abdruck der Spitze wahrzunehmen (vgl. Abbildung 6.28 im Anhang). In Übereinstimmung damit beschreibt die Kraft einen stark vertikalen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 4.34). Generell zeichnen sich alle Messungen dieser Optimierung durch einen stärkeren Kraftanstieg im frühen Kompressionsstadium aus als die Messungen des Standards $nk(O)_{PBCA/PFD}$. Selbst die Partikel der standardisierten Probe $nk(O^{Opti1}a_{11})_{PBCA/PFD}$ leisten mit der geringsten Anfangssteigung einen deutlich stärkeren Widerstand gegen die Einkerbung als die Partikel der Muttersynthese (vgl. dazu Abbildung 6.31 im Anhang). Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Einkerbungsexperimente kurz skizziert. Für jede Probenreihe (a_{1j} bis a_{3j} , konstante Tensidkonzentration) werden die Kraft-Weg-Kurven zusammenfassend in einem Diagramm dargestellt (siehe Abbildungen 4.33, 4.34 und 4.35). Die entsprechenden Vorher-Nachher-Aufnahmen sowie die Cross-Section sind im Anhang in den Abbildungen 6.13 bis 6.30 aufgeführt.

Probenreihe a_{1j} : 100% Tensidgehalt

Probe a_{11} (Abbildungen 6.13 und 6.14 für p1 bzw. p2 im Anhang): In beiden Fällen ist, wie zu erwarten, eine Faltung zu beobachten, einhergehend mit einer deutlichen Abnahme der Partikelhöhe bei Partikel 1. Partikel 2 zeigt eine geringfügige Größenänderung als Folge der Einkerbung. Aus einem Vergleich der Kraftkurven lassen sich für beide Partikel die geringsten Anfangskompressionskonstanten, abgeleitet aus den Anfangssteigungen, dieser Probenreihe berechnen (siehe Abbildung 4.33). Sie besitzen demnach eine verhältnismäßig weiche Kapselwand. Der charakteristische Steigungseinbruch ist bei Partikel 2 deutlich stärker ausgeprägt als bei Partikel 1. Für beide Partikel geben die Kraftkurven kein vollständiges Eindringen der Spitze an.

Probe a_{12} (Abbildungen 6.15 und 6.16 für p1 bzw. p2 im Anhang): Mit einem Monomeranteil von 50% reagiert Partikel 1 mit einem regelrechten Aufbrechen der Struktur, was sich auch im Profil der Cross-Section widerspiegelt. Auch die Nachher-Aufnahme des zweiten Partikels erinnert eher an einen Spalt als an eine Faltung. Dementsprechend weisen die zugehörigen trace-Kurven einen recht steilen Kraftanstieg auf, zurückzuführen auf eine harte und brüchige Partikelstruktur. Die Spitze durchdringt die Partikel vollständig, wobei Partikel 2 dem Ergebnis der Cross-Section zufolge ein partielles Wiederaufwölben der Kapselwand erfährt.

Probe a_{13} (Abbildungen 6.17 und 6.18 für p1 bzw. p2 im Anhang): Bei einem Monomergehalt von lediglich 10% ist für Partikel 1 eine potenzielle Faltung zu verzeichnen, allerdings begrenzt sich die Ausdehnung des Faltungsmusters lediglich auf den mittleren Oberflächenbereich. Der Verlauf der Tracekurve weist erst gegen Ende eine erkennbare Änderung des Steigungsverhaltens auf. Möglicherweise wurde der Einkerbungsprozess zu früh abgebrochen, so dass die Spitze nicht weit genug in das Partikel eindringen konnte, um ein ausgewachsenes Faltungsprofil auszulösen. Daher ist auch keine Veränderung der Partikelhöhe und/-breite detektierbar. Partikel 2 scheint hingegen nicht korrekt getroffen worden zu sein. Es ist eine Einkerbung im peripheren Bereich der Partikeloberfläche zu erkennen, wobei der Aufbau der Tracekurve dem typischen Kurvenverlauf für Kapselstrukturen folgt.

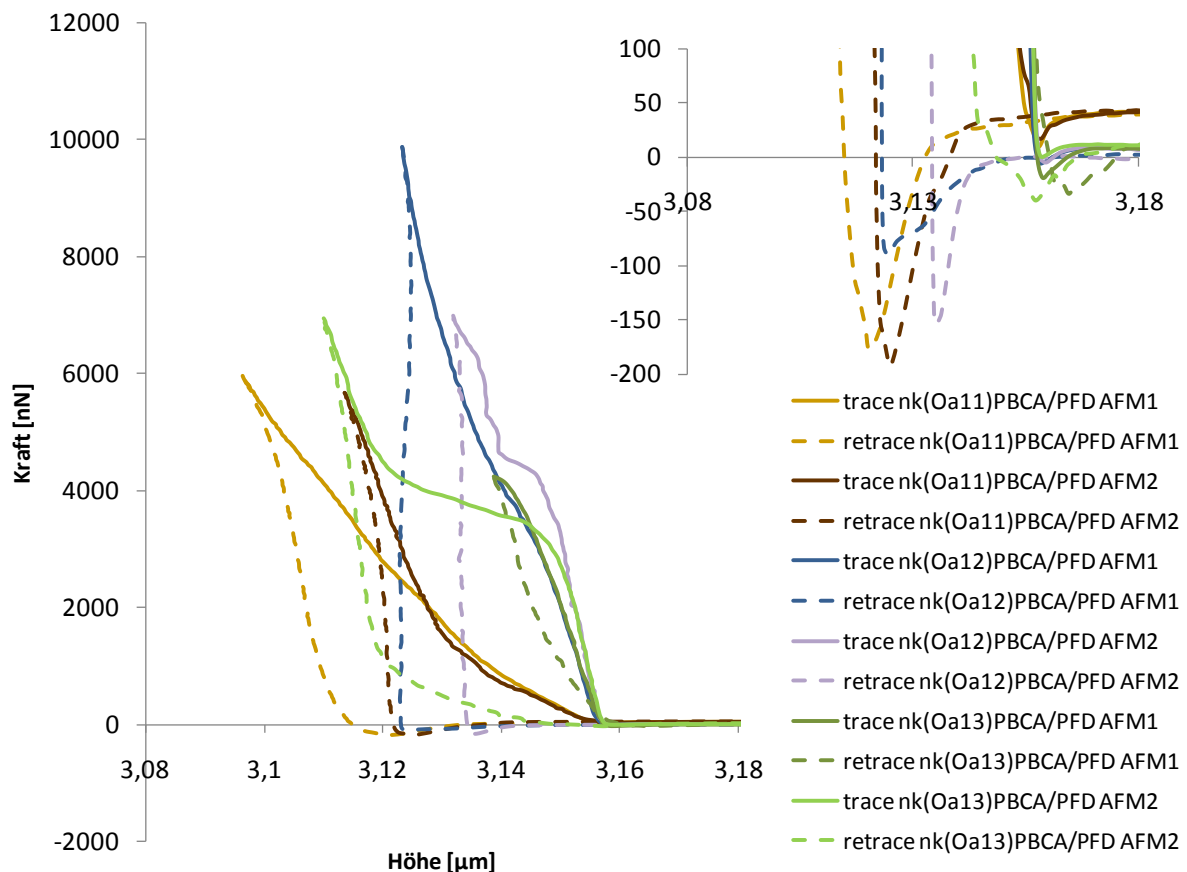


Abbildung 4.33: Gegenüberstellung der Kraft-Weg-Kurven aus den Einkerbungsexperimenten der Probenreihe a_{ij} (konstante Tensidkonzentration) der Optimierung 1. Oben rechts: Vergrößerung der Kurvenverläufe im Bereich des jump to contact.

Probenreihe a_{2j} : 50% Tensidgehalt

Probe a_{21} (Abbildungen 6.19 und 6.20 für p1 bzw. p2 im Anhang): Mit einem Monomergehalt von 100% lässt sich bei beiden Partikeln dieser Probe eine Art Faltung beobachten, welche sich bei Partikel 1 nicht über die gesamte Partikellänge erstreckt. Dem Kraftkurvenverlauf in Abbildung 4.34 ist zu entnehmen, dass die Spitze, wie im Fall von Partikel 1 der Probe a_{13} , nicht sehr weit in das Partikel eindringen konnte. Ein Grund dafür könnte die Teilchengröße

oder auch eine ungünstige Auftreffposition der Messspitze sein. Die trace-Kurve der zweiten Messung verläuft im Anstieg weniger steil als die Kraftkurve der ersten Messung. Eine Änderung der Steigung hinsichtlich einer Kern-Schale-Struktur kann beobachtet werden, wobei Partikel 2 nicht gänzlich eingedrückt wird.

Probe a_{22} (Abbildungen 6.21 und 6.22 für p1 bzw. p2 im Anhang): Bei dieser Probe scheinen entweder Partikel unter den beobachteten Partikeln zu liegen oder es kommt, aufgrund einer kontaminierten Spitze, zu verdoppelten Darstellungen in den Aufnahmen. Die Ausbildung eines charakteristischen Faltungsmotivs bleibt bei beiden Partikeln aus. Während die Oberfläche von Partikel 1 eine örtlich begrenzte Kerbe zeigt, scheint Partikel 2 lediglich seitlich aufgebrochen zu sein. Die Kraftkurven verlaufen ähnlich zu den Kraftkurven der Probe a_{21} .

Probe a_{23} (Abbildungen 6.23 und 6.24 für p1 bzw. p2 im Anhang): Mit einem Monomergehalt von 10% weist Partikel 1 nach dem Experiment kein typisches Faltungsmuster auf. Die Aufnahmen erwecken vielmehr den Eindruck als würde sich polymeres Wandmaterial nach dem Herauffahren der Spitze teilweise wieder über die entstandene Öffnung legen. Partikel 2 zeigt hingegen eine Faltung. Die trace-Kurven beider Messungen sind vergleichbar. Die Anfangssteigungen sind größer als die der anderen Kraftkurven der Probenreihe a_{2j} , was auf eine stärkere Resistenz der Partikelschale gegen die Kompression schließen lässt. Auch hier werden die Partikel nicht vollständig von der Spitze durchstoßen.

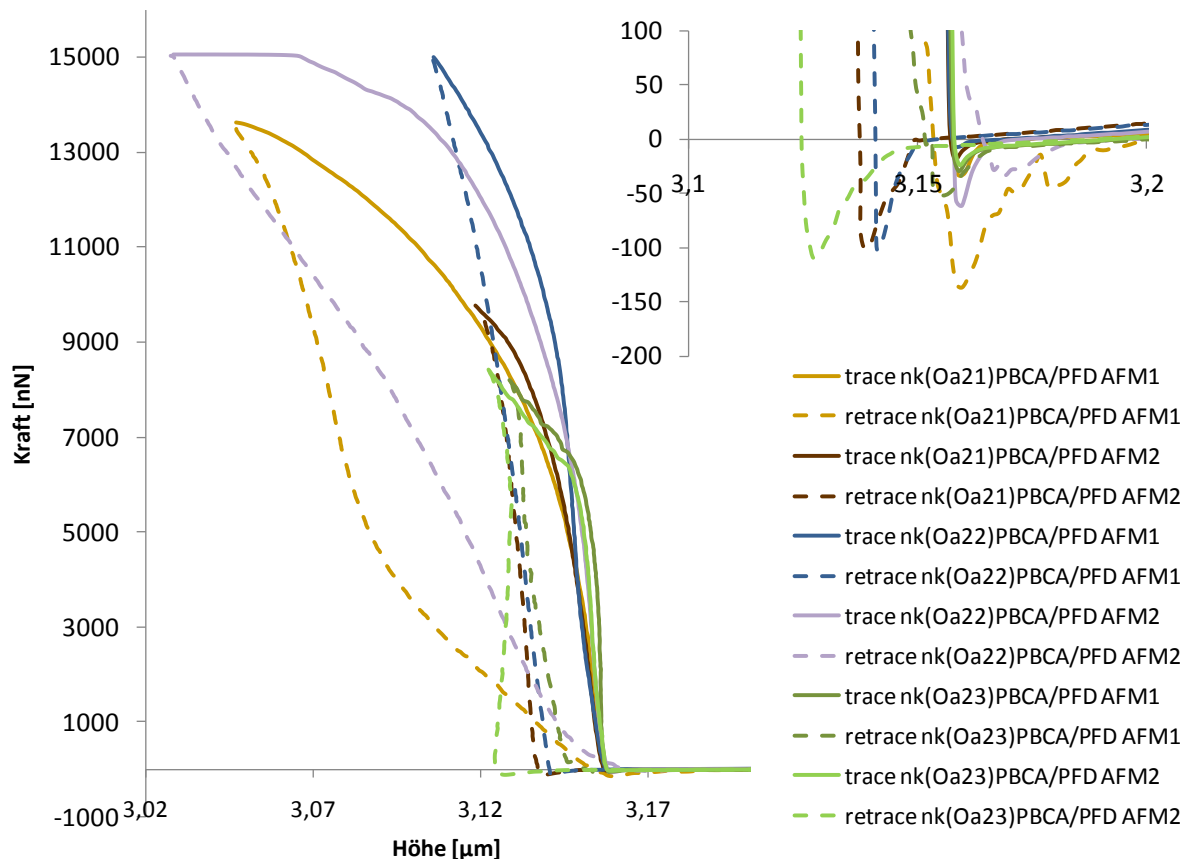


Abbildung 4.34: Gegenüberstellung der Kraft-Weg-Kurven aus den Einkerbungsexperimenten der Probenreihe a_{2j} (konstante Tensidkonzentration) der Optimierung 1. Oben rechts: Vergrößerung der Kurvenverläufe im Bereich des jump to contact.

Probenreihe a_{3j} : 20% Tensid

Probe a_{31} (Abbildungen 6.25 und 6.26 für p1 bzw. p2 im Anhang): Ähnlich Partikel 1 der Probe a_{23} weist auch Partikel 1 dieser Probe mit einem Monomeranteil von 100% eine Einkerbung auf, die zum Teil von Partikelmaterial verdeckt wird. Hierbei reicht die Vertiefung fast bis zum Partikelboden, wie es dem Profil der Cross-Section entnommen werden kann. Eine Abnahme der Partikelhöhe und eine Verbreiterung sind nur geringfügig zu erkennen. Das etwas größere Partikel 2 zeigt eine Faltung, die sich über die ganze Partikellänge ausdehnt. Die Kraftkurven besitzen die geringsten Anfangssteigungen der Probenreihe a_{3j} (vgl. Abbildung 4.35). Die Kraftkurve der zweiten Partikelmessung deutet auf eine vollständige Durchdringung des Partikels hin.

Probe a_{32} (Abbildungen 6.27 und 6.28 für p1 bzw. p2 im Anhang): Die Aufnahmen dieser Probe zeigen verdoppelte Darstellungen der Partikel. Beide Einkerbungsmuster sind nicht mittig auf der Partikeloberfläche ausgerichtet. Partikel 2 weist lediglich einen undeutlichen Abdruck der Spitze auf und wurde kaum eingedrückt. Das lässt sich auch am Verlauf der Kraftkurve erkennen. Der Hinweg wird praktisch nur durch eine Senkrechte beschrieben, was einer harten, nahezu inkompressiblen Partikeloberfläche entspricht. Die Kraftkurve der

ersten Messung zeigt nach einem ähnlich steilen Kraftanstieg eine deutliche Änderung der Steigung. Eine vollständige Durchdringung des Partikels durch die Messspitze findet allerdings nicht statt.

Probe a_{33} (Abbildungen 6.29 und 6.30 für p1 bzw. p2 im Anhang): Für die Probe mit der geringsten Monomer- sowie Tensidkonzentration ergeben sich sphärische, ähnlich große Partikel, die nach dem Einkerbungsexperiment eine typische Faltung aufweisen. Für Partikel 2 zeigt sich dies allerdings nur auf halber Partikellänge. Der Verlauf der Kraftkurven ist miteinander vergleichbar. Beide weisen den charakteristischen Steigungseinbruch auf. Die Durchdringung verläuft aber auch in diesem Fall nicht vollständig.

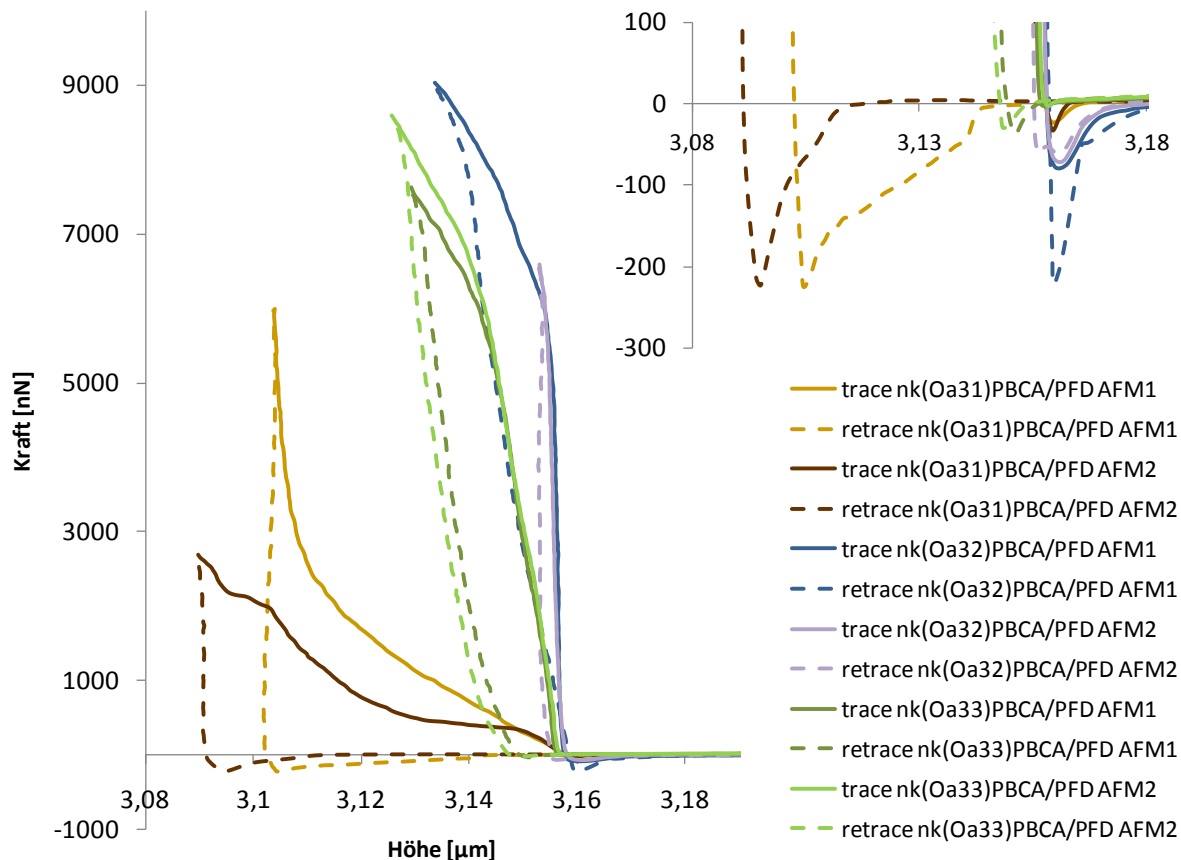


Abbildung 4.35: Gegenüberstellung der Kraft-Weg-Kurven aus den Einkerbungsexperimenten der Probenreihe a_{3j} (konstante Tensidkonzentration) der Optimierung 1. Oben rechts: Vergrößerung der Kurvenverläufe im Bereich des jump to contact.

Aus den Resultaten der Einkerbungsexperimente lässt sich somit lediglich die Information gewinnen, dass die Reduktion der Eduktkonzentrationen im Rahmen dieses Optimierungsversuches offenbar nicht soweit fortgeführt wurde, um mit Hilfe der gewählten Untersuchungsmethoden grundlegende Änderungen bzw. Abweichungen von der Ausgangssynthese aufdecken zu können. Zusammen mit den Ergebnissen der Particle Tracking-Messungen ist weder ein Einfluss auf die Stabilität der Dispersion oder auf die Partikelgröße noch

auf die Beschaffenheit der Partikeloberfläche oder auf ihr elastoplastisches Verhalten zu erkennen. Die allgemein starken Anfangssteigungen könnten ein Hinweis auf härtere Kapselwände sein. Detailliertere Auskünfte geben die Kraftkurven jedoch nicht. Da die Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA/PFD}}$ mit der geringsten Tensid- sowie Monomerkonzentration sowohl in den PT- als auch in den AFM-Messungen mit repräsentativen und reproduzierbaren Ergebnissen überzeugen konnte, wird diese Synthesevorschrift für weitere Untersuchungen verwendet. Um die Eigenarten der Kapselnatur zu untermauern, wurden nach dieser Vorschrift eine korrespondierende Emulsion und eine Nanosphärendispersion hergestellt, indem auf Monomer bzw. Perfluorodecalin verzichtet wurde. Konkrete Angaben über die jeweilige Synthese sind in Kapitel 3.4.1 zu finden. Beide Proben werden mittels PT und AFM untersucht.

4.3.1.3 Ergebnisse und Diskussion der Analyse der polymerfreien Emulsion

Die Probe der polymerfreien Emulsion wird mit der Abkürzung $\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$ gekennzeichnet. Ohne die Zugabe von Monomer können sich nur PFD-Tropfen bilden, die von Tensidmolekülen stabilisiert werden. Aus den AFM-Aufnahmen geht hervor, dass diese Tropfen recht groß sind (siehe Abbildung 4.36). Entsprechend der Cross-Section ergeben sich eine Partikelhöhe zwischen 70 nm und 80 nm und eine -breite von ungefähr $1,5\text{ }\mu\text{m}$. Mit einem Höhen-Breiten-Verhältnis von ca. 1 zu 20 handelt es sich bei den Tropfen um sehr flache Teilchen, wobei sich die Oberfläche durch starke Unebenheiten in ihrer Struktur auszeichnet, welche sich vermutlich durch die Benetzung mit Tensidmolekülen ergibt. Die dunkelfeldmikroskopische Analyse bestätigt die extreme Tropfengröße durch eine sehr breite Größenverteilung (siehe Abbildung 4.37). Aufgrund von Detektionsschwierigkeiten sind die Häufigkeitswerte recht gering, eine Aufweitung des Größenbereichs ist im Vergleich zu den Kapseldispersionen im Allgemeinen trotzdem zu erkennen. Aus der Gaußanalyse ergeben sich für die Emulsion die in Tabelle 4.6 aufgeführten Werte.

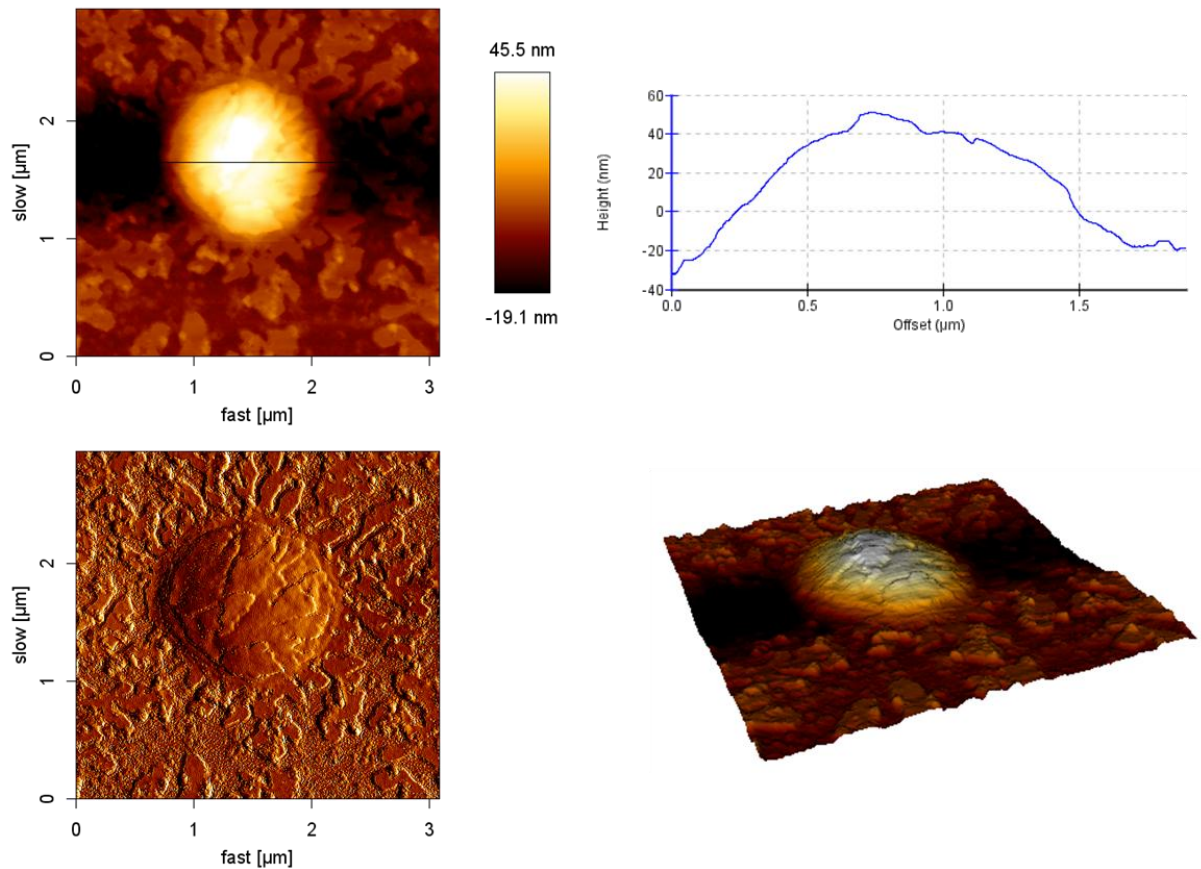


Abbildung 4.36: AFM-Aufnahme der polymerfreien Emulsion $\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$ vor dem Einkerbungs-experiment. Oben: Heightbild (links) und Cross-Section (rechts) des Tropfens. Unten: Errorbild (links) und dreidimensionale Darstellung des Höhenbildes (rechts).

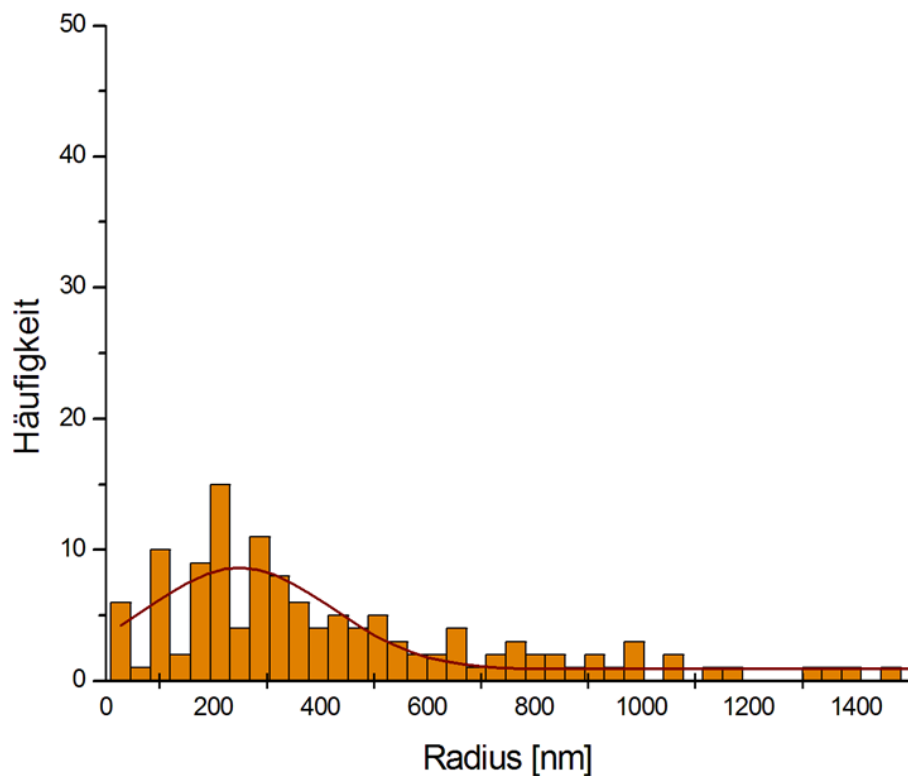


Abbildung 4.37: Größenhistogramm der der polymerfreien Emulsion $\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalyse für die polymerfreie Probe $\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$ der Optimierung 1

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$ PT	249 ± 23	341 ± 55

Nach dem Einkerbungsexperiment sind in den AFM-Aufnahmen keine wesentlichen Veränderungen zu erkennen (vgl. Abbildung 4.38). Das Eindringen der Spitze hat keine Auswirkungen auf die Höhe oder die Breite des Tropfens und hinterlässt kein Faltungsmuster in der Oberflächenstruktur, was durchaus zu erwarten war. Dies verdeutlicht auch der Verlauf der Kraftkurve in Abbildung 4.39. Der Tropfen leistet nahezu keinen Widerstand gegen die Kompressionsabsicht und verhält sich elastisch. Der aufzubringende Kraftaufwand ist gering und schwankt um einen nahezu konstanten Wert. Der charakteristische Vorher-Nachher-Effekt der Kapselmessungen bleibt in diesem Fall aus.

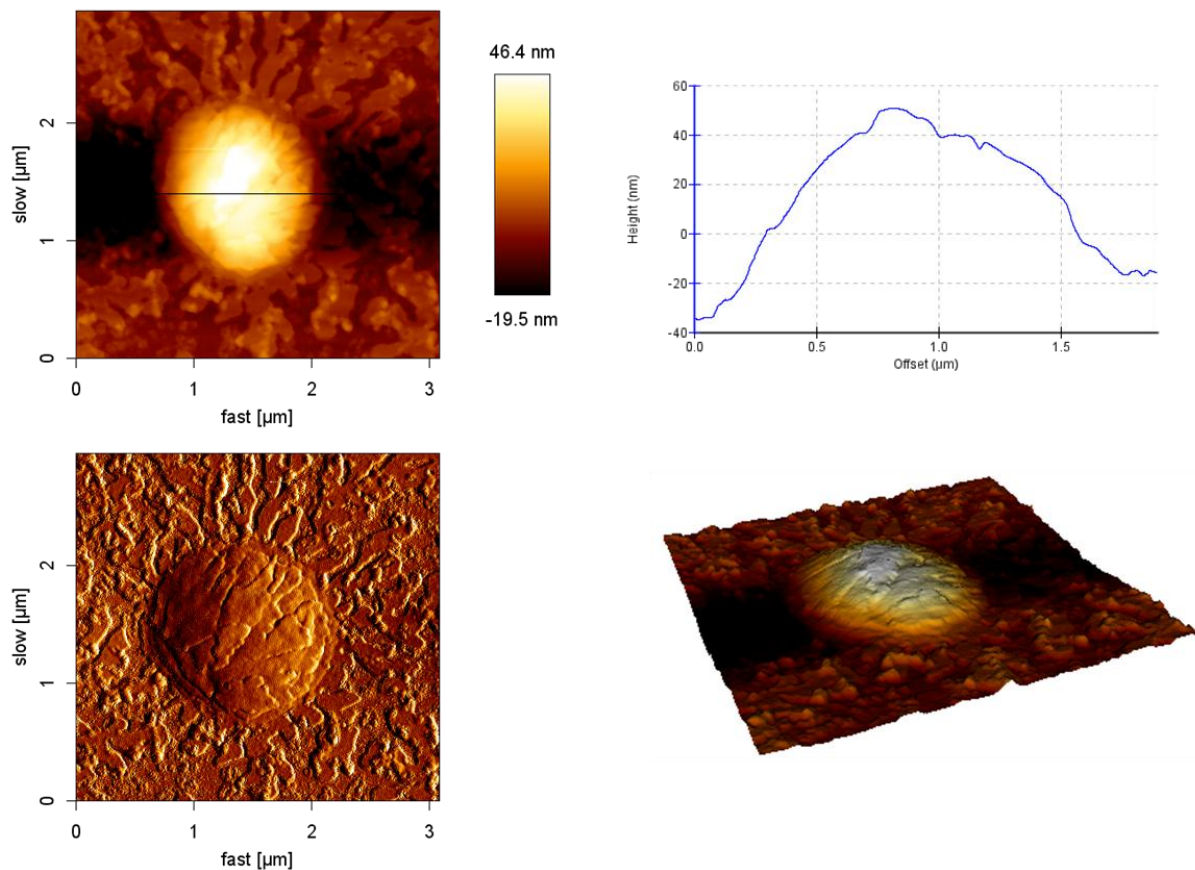


Abbildung 4.38: AFM-Aufnahme der polymerfreien Emulsion $\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$ nach dem Einkerbungsexperiment. Oben: Heightbild (links) und Cross-Section (rechts) des Tropfens. Unten: Errorbild (links) und dreidimensionale Darstellung des Heightbildes (rechts).

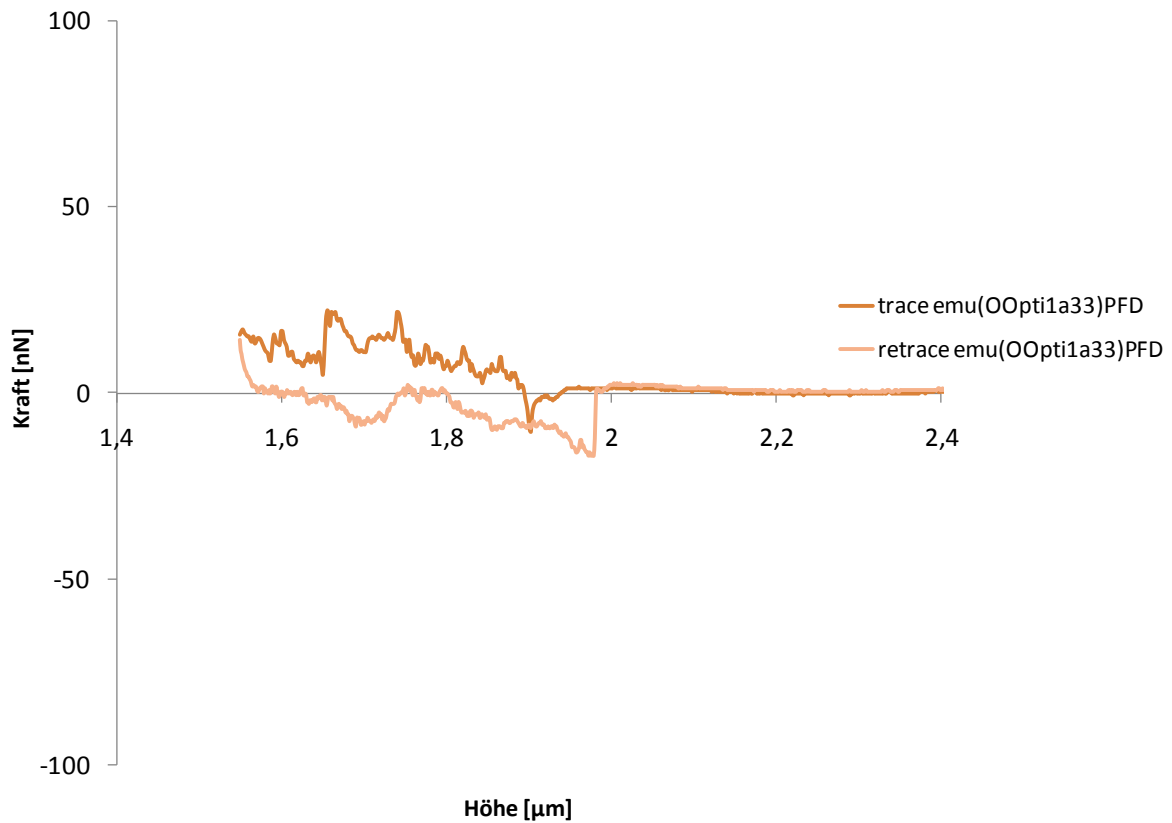


Abbildung 4.39: Kraft-Weg-Diagramm aus dem Einkerbungsexperiment an der polymerfreien Emulsion $\text{emu}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PFD}}$.

4.3.1.4 Ergebnisse und Diskussion der Analyse der PFD-freien Nanosphärendispersion

Die PFD-freie Nanosphärendispersion, Probenbezeichnung $\text{ns}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA}}$, wird ohne das Kernmaterial Perfluordecalin hergestellt, so dass sich reine Polymerpartikel ohne Kern-Schale-Struktur ausbilden. Mit einer Teilchengröße von ungefähr 50 nm in der Höhe und 220 nm in der Breite liegen die erzeugten Nanosphären ungefähr in der Größenordnung von Nanokapseln (siehe Abbildung 4.40). Ein direkter Vergleich mit den korrespondierenden Nanokapseln und der Emulsion zeigt in Abbildung 4.41, als Ergebnis der Particle Tracking-Messungen, eine leichte Linksverschiebung der Nanosphärenverteilung als kompaktere Teilchen zu etwas kleineren Radien hin. Tabelle 4.7 gibt die Resultate der Gaußanalyse wieder.

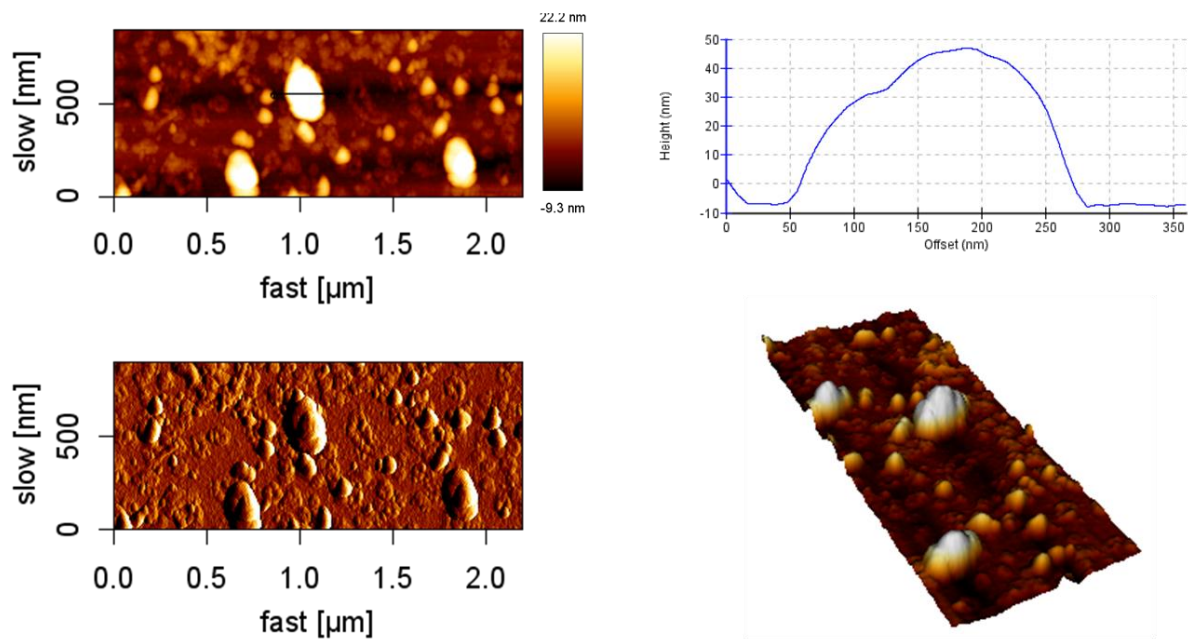


Abbildung 4.40: AFM-Aufnahme der PFD-freien Nanosphären $\text{ns}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA}}$ vor dem Einkerbungs-experiment. Oben: Heightbild (links) und Cross-Section (rechts) des Partikels. Unten: Errorbild (links) und dreidimensionale Darstellung des Höhenbildes (rechts).

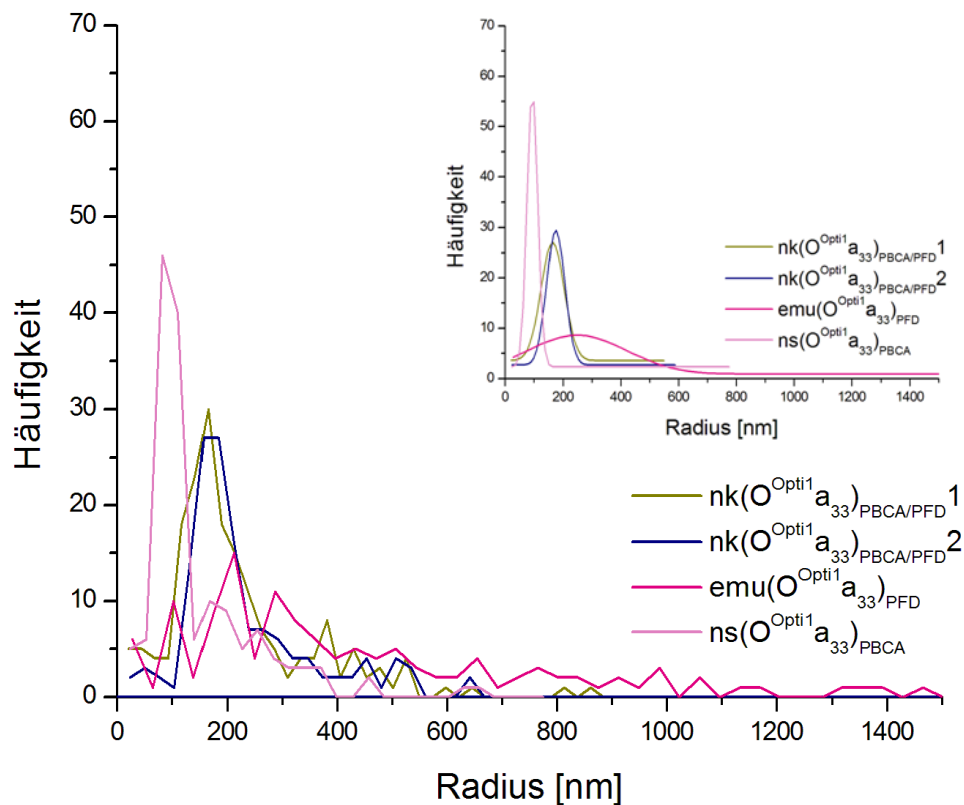


Abbildung 4.41: Größenverteilung der PFD-freien Nanosphären $ns(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA}$ im Vergleich mit den Größenverteilungen der Proben $emu(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PFD}$ und $nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$. Oben rechts: Korrespondierende Normalverteilungen.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalyse für die PFD-freien Nanosphären $ns(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA}$ der Optimierung 1

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$ns(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA}$ PT	95 ± 1	32 ± 8

Aus den AFM-Aufnahmen wird deutlich, dass die Polymersphären eine sehr unebene Oberflächenstruktur aufweisen. Trotz geringerer Partikelhöhe ist nach dem Einkerbungsexperiment kein explizites Eindrückmuster oder eine Faltung zu erkennen bzw. auszumachen (vgl. Abbildung 4.42). Der Verlauf der trace-Kurve wird von ungewohnten Schwankungen begleitet, so dass kein typischer Steigungseinbruch bzw. keine deutliche Steigungsänderung als Indiz für die Existenz eines Partikelkerns mit andersartigen Materialeigenschaften beobachtet werden kann (siehe Abbildung 4.43). Mit einer Länge von fast 60 nm entspricht dieser Abschnitt der Partikelhöhe vor dem Kompressionsversuch. Anhand des Übergangs in den vertikalen Kraftverlauf ist auf eine vollständige Durchdringung des Partikels durch die AFM-

Spitze zu schließen. Gemäß des Höhenprofils der Cross-Section ist auch hier zu beobachten, dass sich die Partikelstruktur nach Entfernen der AFM-Spitze teilweise regeneriert.

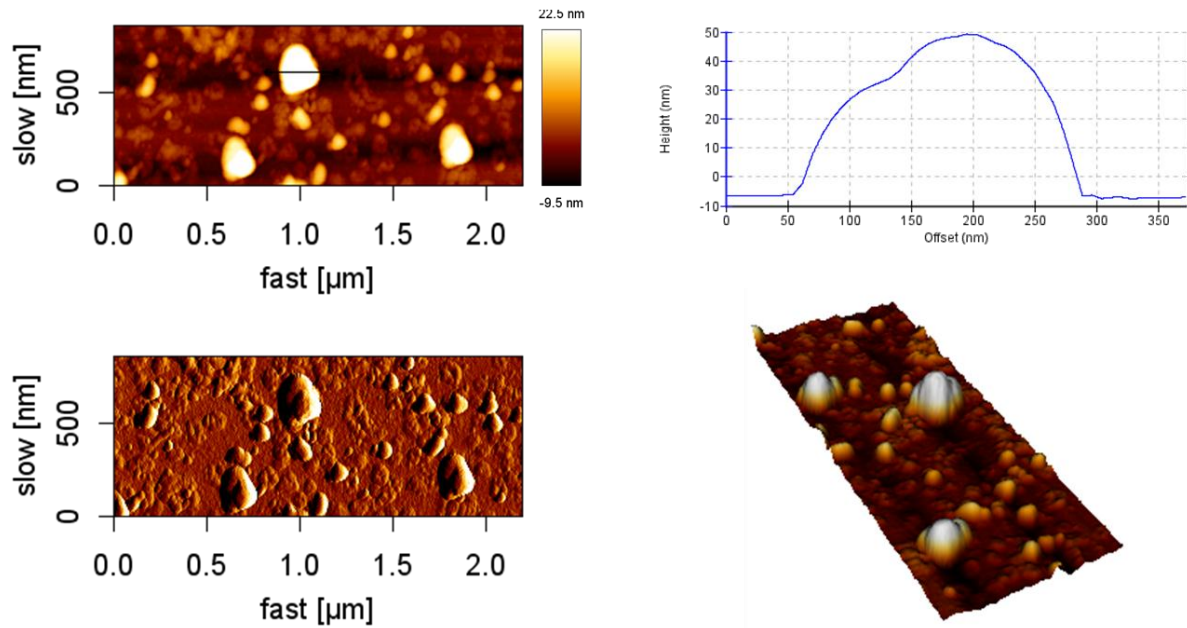


Abbildung 4.42: AFM-Aufnahme der PFD-freien Nanosphären $\text{ns}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA}}$ nach dem Einkerbungsexperiment. Oben: Heightbild (links) und Cross-Section (rechts) des Partikels. Unten: Errorbild (links) und dreidimensionale Darstellung des Heightbildes (rechts).

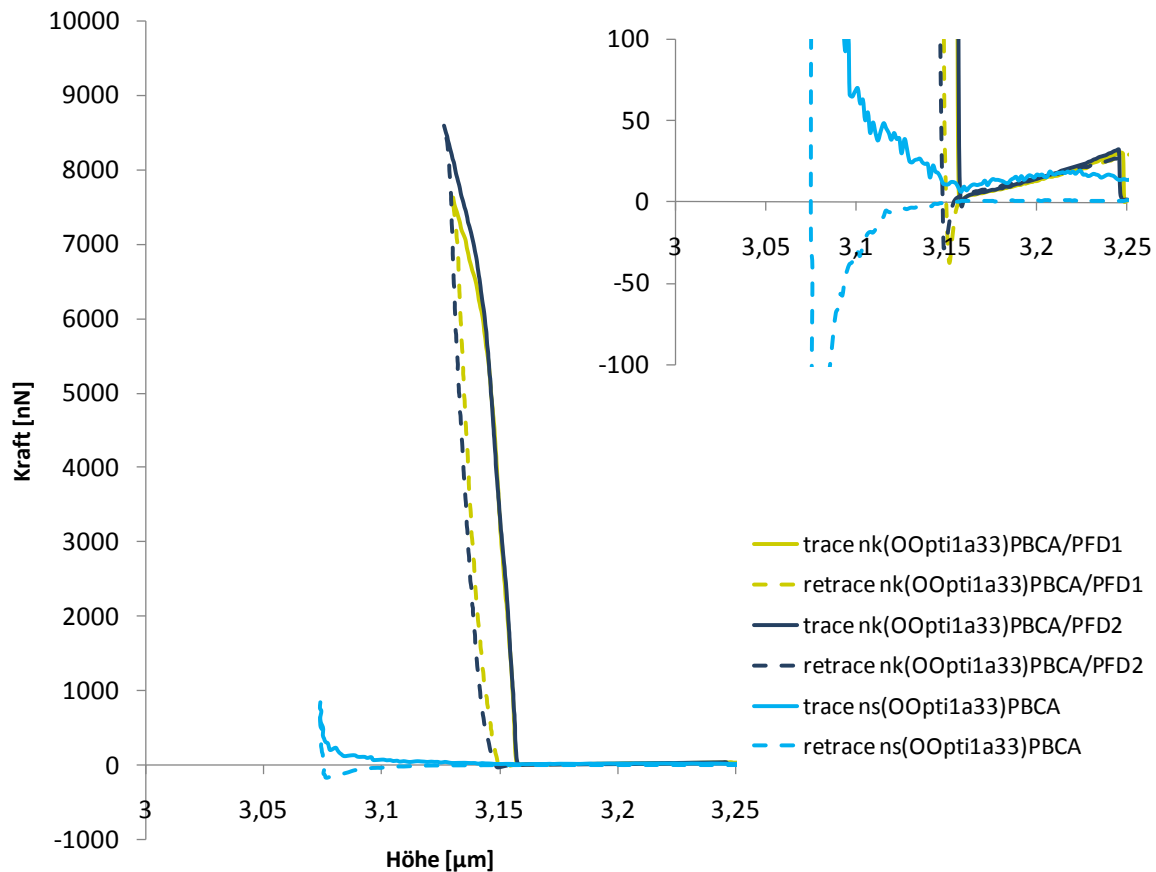


Abbildung 4.43: Kraft-Weg-Diagramm aus dem Einkerbungsexperiment an einer PFD-freien Nano-sphäre $ns(O^{Opti1}_{a33})_{PBCA}$ im Vergleich mit Kraftkurvenverläufen aus den Einkerbungsexperimenten der Probe $nk(O^{Opti1}_{a33})_{PBCA/PFD}$. Oben rechts: Vergrößerung der Kurvenverläufe im Bereich des jump to contact.

Aus den Resultaten der Vergleichsmessungen an den Proben der Emulsion und der Nano-sphären lassen sich direkt zwei wichtige Erkenntnisse ableiten. Zum Einen zeigt sich, dass die gewählten Charakterisierungsmethoden des Particle Tracking, aber vor allem der AFM, durchaus geeignet sind, um typische Eigenschaften von Nanostrukturen mit ausdrücklichem Kern-Schale-Aufbau zu überprüfen und nachzuweisen. Zum Anderen ergibt sich folglich, dass es sich bei den gewünschten Produkten tatsächlich um Nanokapseldispersionen handelt und ihre Synthese über die getesteten bzw. optimierten Präparationswege möglich ist.

Darüberhinaus werden zwei weitere „Optimierungsversuche“ durchgeführt. Optimierung 2 (siehe Kapitel 3.4.2.1) beschreibt die Kapselpräparation unter stärkerer Anlehnung an die Syntheseroute nach S. A. Vitale und J. L. Katz [90]. Hierbei werden Proben mit unterschiedlichen Phasenverhältnissen zwischen organischer und wässriger Phase erzeugt. Zugleich wird ein Durchmischen der beiden Phasen durch Rührbewegungen unterlassen. Das Zusammenführen der beiden Phasen erfolgt in umgekehrter Reihenfolge (wässrige Phase zur organischen Phase) gegenüber der Standardsynthese. Optimierung 3 soll die Synthese hinsichtlich eines mäßigeren Verbrauchs giftiger Lösemittel verbessern, so dass nur unter Ver-

wendung von Ethanol als organisches Lösemittel gearbeitet wird. Die Umsetzung verläuft über die Rotor-Stator-Rührer-Variante (siehe Kapitel 3.4.2.2).

4.3.2 Optimierung durch Angleichung der Syntheseroute von Vitale und Katz – Optimierung 2

Aus dem Optimierungsansatz 2 gehen zwei Proben hervor. $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}20})_{\text{PBCA/PFD}}$ kennzeichnet die Probe mit einem Verhältnis organischer zu wässriger Phase von 1 zu 20, $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}9})_{\text{PBCA/PFD}}$ wurde über ein Phasenverhältnis von 1 zu 9 hergestellt. In beiden Fällen werden stabile, milchig trübe Dispersionen erhalten. Die analytischen Untersuchungen mittels PT und AFM laufen wie zuvor ab.

4.3.2.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle Tracking-Messungen der Optimierung 2

Die hier zu erwartenden Größenverteilungen liegen in einem ähnlichen Bereich; für $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}20})_{\text{PBCA/PFD}}$ findet man Werte zwischen 70 und 200 nm und für $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}9})_{\text{PBCA/PFD}}$ zwischen 60 und 140 nm. Die Ergebnisse der Gaußanalyse sind nachfolgend in tabellarischer Form aufgeführt (siehe Tabelle 4.8). Die Größenverteilungen sind in Abbildung 4.44 dargestellt. Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}9})_{\text{PBCA/PFD}}$ weist im Vergleich zu der Probe mit einem Phasenverhältnis von 1 zu 20 eine stärker monodisperse Größenverteilung mit einer leichten Linksverschiebung und sehr hohen Häufigkeitswerten auf. Gegenüber den Verteilungsbreiten der Muttersynthese, $\text{nk}(\text{O})_{\text{PBCA/PFD}1\text{ PT}}$, $\text{nk}(\text{O})_{\text{PBCA/PFD}2\text{ PT}}$ und $\text{nk}(\text{O})_{\text{PBCA/PFD}3\text{ PT}}$, sind die Partikel der optimierten Proben im Allgemeinen etwas kleiner (vgl. Abbildung 4.45). Diese Beobachtung widerspricht den Überlegungen von S. A. Vitale und J. L. Katz [90], die anhand ihrer Experimente die These aufgestellt haben, dass die Partikelgröße lediglich dem Verhältnis von Öl zu Lösemittel unterliegt und umso kleiner ausfällt, je kleiner das Verhältnis ist. Sie erklären dies durch eine geringere Wahrscheinlichkeit, eine ausreichende Anzahl von Ölmolekülen in der Nähe eines Keims anzutreffen, um zum Wachstum eines Keims beizutragen (vgl. Kapitel 2.2.2.3). Für die Proben der Optimierung 2 wird ein Phasenverhältnis von 1 (PFD) zu 100 (Lösemittelgemisch) angesetzt, das Verhältnis der Standardsynthese beträgt hingegen 1 zu 250. Warum Letztere trotz eines kleineren Öl-zu-Lösemittel-Verhältnisses im Durchschnitt größere Teilchen erzeugt, ist dadurch nicht zu erklären. Neben der Änderung der Volumenanteile ist jedoch auch die technische Durchführung entsprechend dem literarischen Experiment umgesetzt worden, so dass die beiden Methoden (Standardsynthese vs. Optimierung 2) unter diesen Umständen nicht direkt miteinander verglichen werden können.

Die Ergebnisse der beiden optimierten Proben sind, im Vergleich untereinander, allerdings mit der von S. A. Vitale und J. L. Katz aufgestellten Hypothese vereinbar. Bei beiden Proben wurde mit einem PFD-zu-Lösemittelgemisch-Verhältnis von 1 zu 100 gearbeitet. Der Unterschied liegt in der hinzugefügten Menge Wasser und nimmt den Messungen zufolge keinen wesentlichen Einfluss auf die Partikelgröße bzw. Größenverteilungen. Laut Literatur [90] beeinträchtigt das Volumen der wässrigen Phase lediglich die Teilchen- oder Partikeldichte, was sich in diesem Fall in erster Näherung in der Höhe der Häufigkeitsmaxima ausdrückt. Hierbei weist die Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}20})_{\text{PBCA/PFD}}$ mit einem deutlich höheren Wasseranteil geringere Partikelhäufigkeiten auf als die Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}9})_{\text{PBCA/PFD}}$.

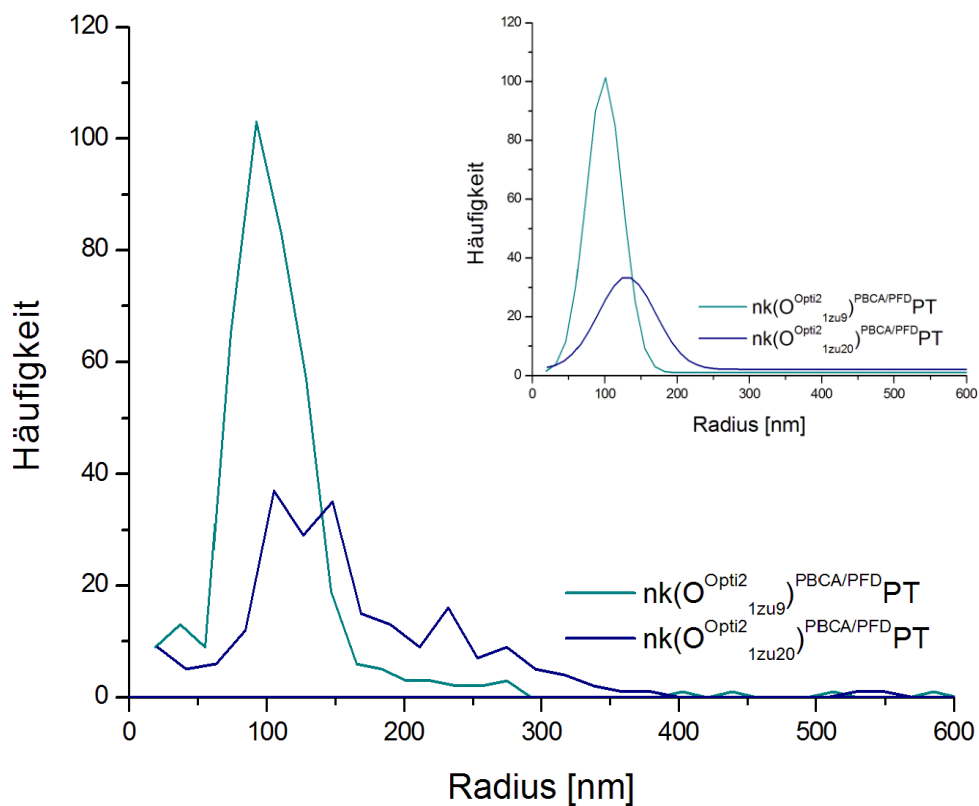


Abbildung 4.44: Größenverteilungen der Proben $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}20})_{\text{PBCA/PFD}}$ und $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu}9})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Optimierungsreihe 2. Oben rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben $nk(O^{Opti2}_{1zu20})_{PBCA/PFD}$ und $nk(O^{Opti2}_{1zu9})_{PBCA/PFD}$ der Optimierung 2

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$nk(O^{Opti2}_{1zu20})_{PBCA/PFD}$ PT	131 ± 4	79 ± 9
$nk(O^{Opti2}_{1zu9})_{PBCA/PFD}$ PT	99 ± 1	50 ± 2

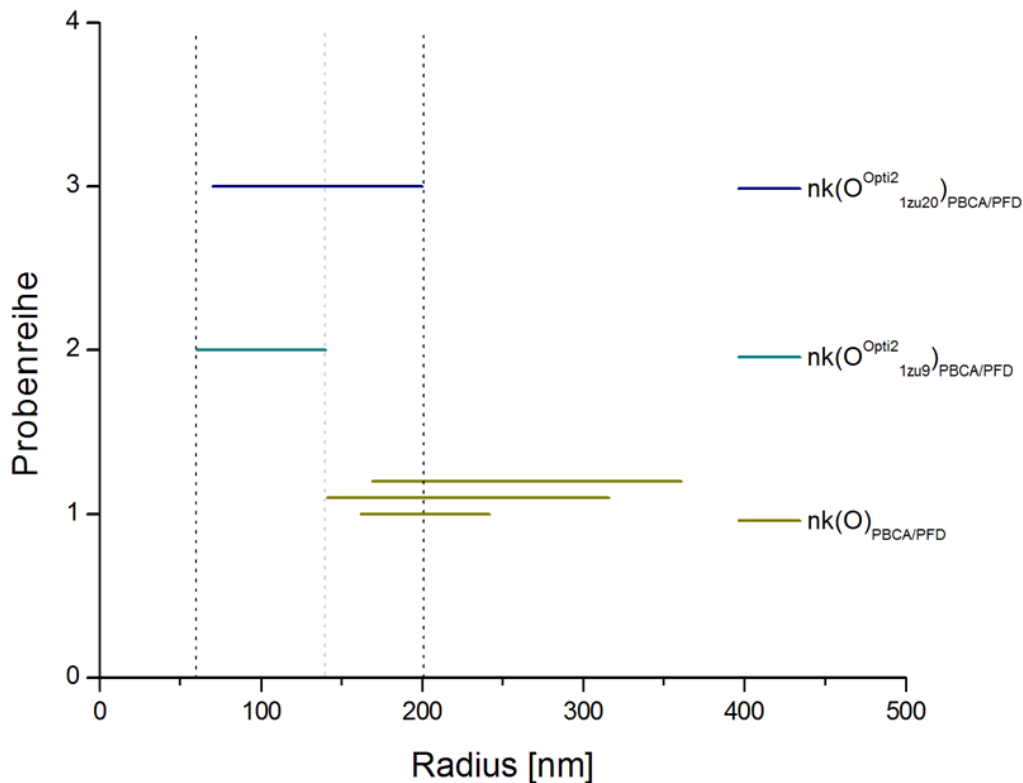


Abbildung 4.45: Auftragung der Hauptverteilungsbreiten der Proben $nk(O^{Opti2}_{1zu20})_{PBCA/PFD}$ und $nk(O^{Opti2}_{1zu9})_{PBCA/PFD}$ der Optimierungsreihe 2 im Vergleich mit den Verteilungsbreiten aus den Messungen der Proben der Muttersynthese $nk(O)_{PBCA/PFD}$. Die vertikalen schwarz-gestrichelten Linien begrenzen den Verteilungsbereich der Proben der Optimierung 2 insgesamt. Die vertikale hellgrau-gestrichelte Linie bildet die obere Grenze der Partikelgrößen der Probe $nk(O^{Opti2}_{1zu9})_{PBCA/PFD}$ und stellt zugleich den Startpunkt der Größenverteilungen der Proben $nk(O)_{PBCA/PFD}$ dar.

4.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der Optimierung 2

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zeigen in den Abbildungen 4.46 und 4.47 für beide Proben sphärische Partikel. Bei der Probe $nk(O^{Opti2}_{1zu20})_{PBCA/PFD}$ wird eine Partikelhöhe von ca. 75 nm und eine Partikelbreite von ungefähr 500 nm gemessen. Durch das Eindringen ist eine Falte entstanden, die sich über die gesamte Partikellänge erstreckt. Das Partikel erfährt eine Verbreiterung um 150 nm bis 200 nm . Anhand des Kraftverlaufs in Abbildung 4.48 ist zu erkennen, dass die Spitze die Kapsel vollständig durchdringt. Aus der Cross-Section ergibt sich eine Falten- bzw. Eindringtiefe von 20 nm bis 25 nm . Wie es schon mehrfach beobachtet werden konnte, scheint sich die Öffnung bis zu einem gewissen Punkt wie-

der zu schließen. Ein ähnliches Resultat ergibt sich für die Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu9}})_{\text{PBCA/PFD}}$. Die Partikelhöhe beträgt vor dem kraftspektroskopischen Experiment ungefähr 90 nm , die Partikelbreite liegt bei rund 400 nm . Der Kompressionsvorgang führt auch hier zur Ausbildung eines Faltenmusters, wobei eine Reduzierung der Partikelhöhe um ca. 20 nm und eine Verbreiterung um ca. 150 nm bis 200 nm beobachtet werden kann. Der Verlauf der Kraftkurve ist kapselcharakteristisch und gibt eine vollständige Durchdringung an, welche sich zum Teil reversibel verhält.

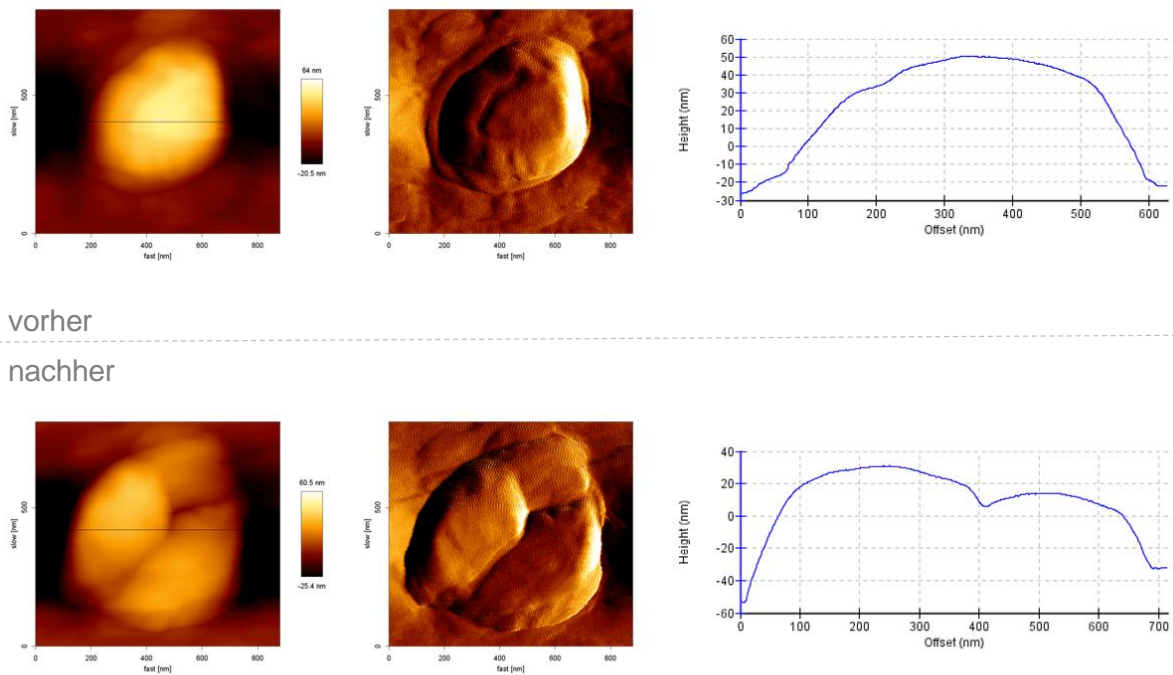
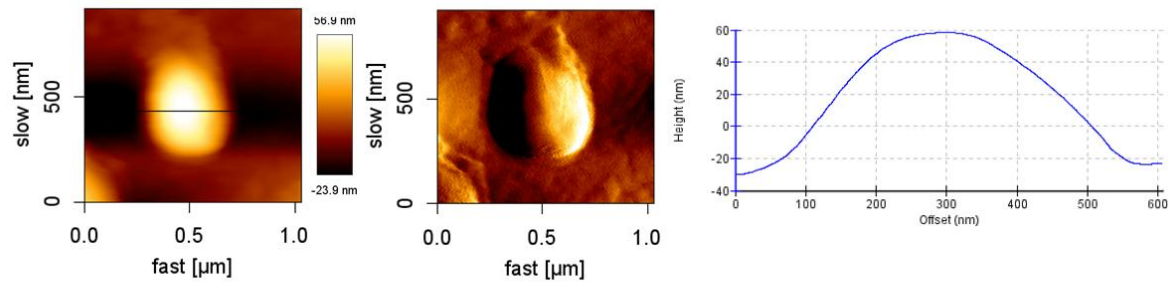


Abbildung 4.46: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an der Probe $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti2}}_{1\text{zu20}})_{\text{PBCA/PFD}}$. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

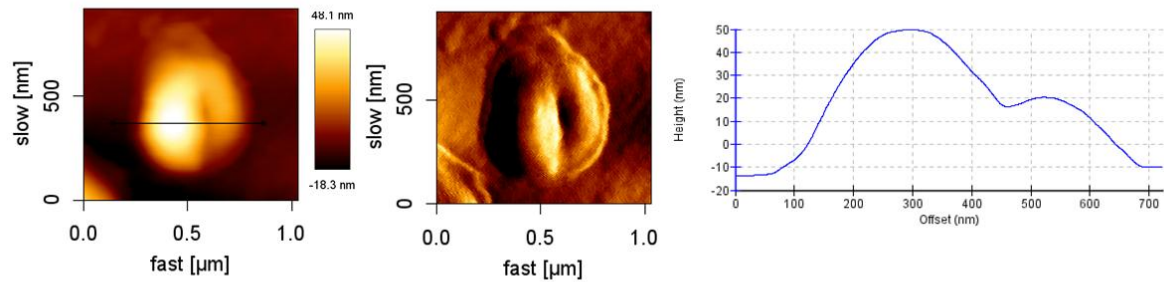


Abbildung 4.47: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an der Probe $nk(O_{Opti2}^{1zu9})_{PBCA/PFD}$. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

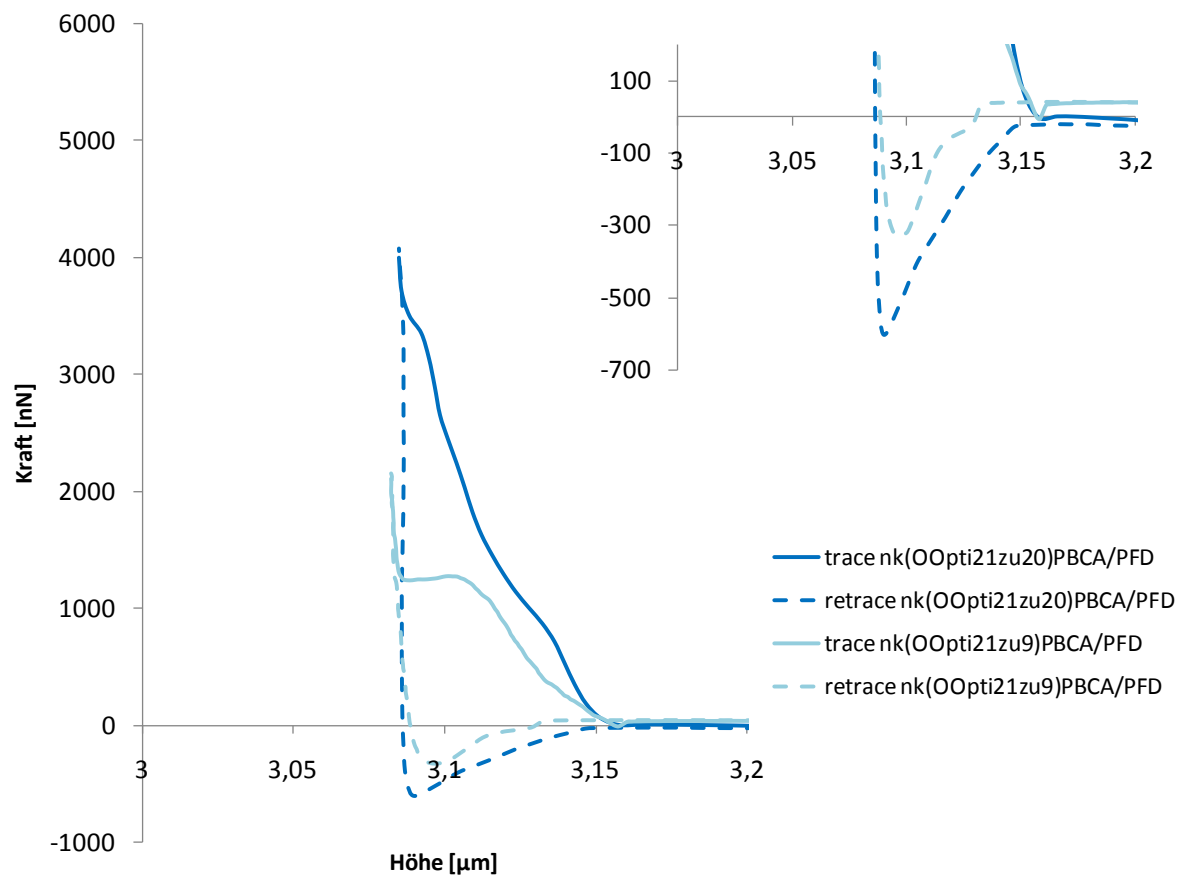


Abbildung 4.48: Kraft-Weg-Diagramm aus den Einkerbungsexperimenten an den Proben $nk(O_{Opti2}^{1zu20})_{PBCA/PFD}$ und $nk(O_{Opti2}^{1zu9})_{PBCA/PFD}$ der Optimierung 2. Oben rechts: Vergrößerung des Kurvenverlaufs im Bereich des jump to contact.

4.3.3 Optimierung durch Verzicht auf giftige Lösemittel – Optimierung 3

Die Probe, die über den dritten Optimierungsansatz hergestellt wird, wird mit der Abkürzung $\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ gekennzeichnet, da sie mittels des Rotor-Stator-Rührers erzeugt wurde. Im Prinzip handelt es sich um einen Versuch, die Rührer-Variante mit der Ouzomethode zu kombinieren, indem zunächst eine Präemulgierung des Perfluorcarbons in dem organischen Lösemittel stattfindet und dieser Emulsion anschließend die wässrige Phase in einem Zug zugeführt wird. Dadurch soll es zu einer feineren und kontrollierteren Verteilung der PFD-Keime und Moleküle während der Nukleationsphase kommen. Eine weitere Abweichung von der Standardsynthese betrifft die Wahl des organischen Lösemittels. Anstelle eines Gemischs, das notwendig ist, um eine echte Lösung des Perfluordecals zu erhalten, wird nur Ethanol verwendet. Auch aus diesem Grund ist es erforderlich, vor dem eigentlichen Keimbildungs- und Wachstumsprozess eine Emulsion zu erzeugen. Die Absicht hinter dieser Syntheseroute ist es, den Gebrauch potentiell toxischer Lösemittel weitestgehend einzuschränken. Bei der erhaltenen Probe handelt es sich, wie in den vorausgegangenen Fällen, um eine milchig-trübe Dispersion. Sie wird mittels PT und AFM untersucht.

4.3.3.1 Ergebnisse und Diskussion der Particle Tracking-Messungen der Optimierung 3

Mit dem Particle Tracking werden zwei Messungen an der Probe durchgeführt, $\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ PT1 und $\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ PT2. Anhand Abbildung 4.49 ist sehr gut zu erkennen, dass die Messungen reproduzierbar sind. Die Verteilungen decken einen vergleichbaren Größenbereich mit ähnlich hohen Häufigkeitswerten ab. Beide Messungen zeigen eine relativ schmale Partikelgrößenverteilung mit Teilchenradien zwischen ungefähr 90 und 200 nm. Tabelle 4.9 gibt die sich jeweils ergebenden Parameter der Gaußanalyse wieder. Die Verteilungsbreiten stimmen gut mit den Hauptverteilungsbreiten der vorausgegangenen Optimierungsversuche 1 und 2 überein (siehe Abbildung 4.50). So sind auch mit dieser Optimierungsmethode Partikel in bekannter Größenordnung produzierbar. Sie fallen im Mittel etwas kleiner aus als die Partikel der Muttersynthese.

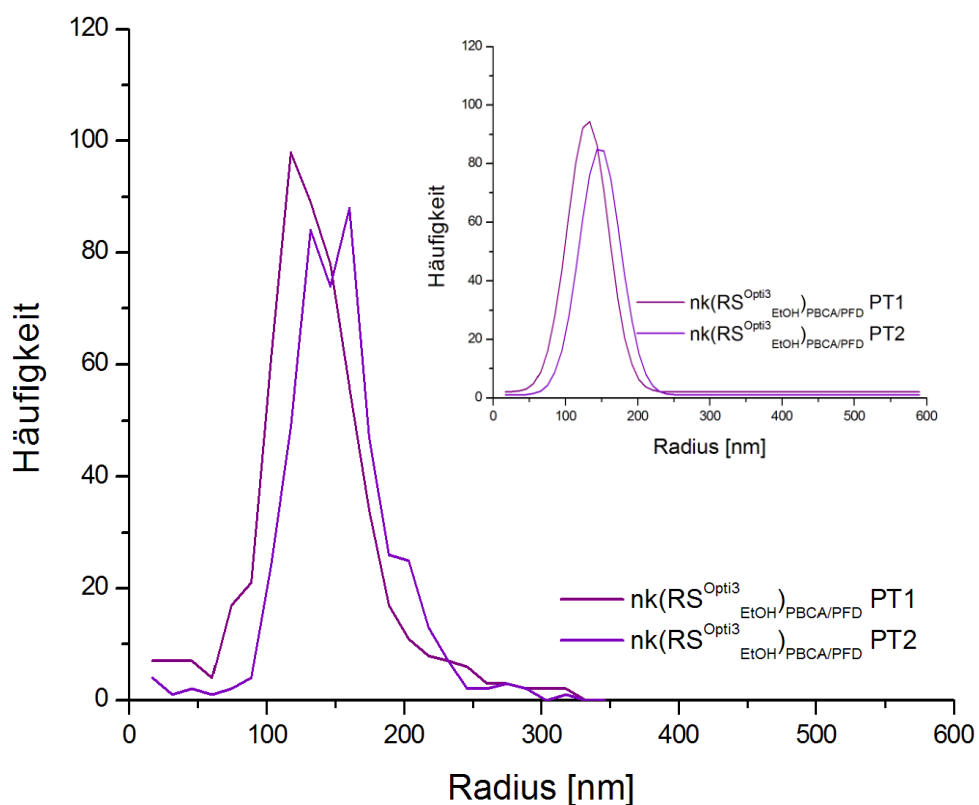


Abbildung 4.49: Größenverteilungen der Probe $\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Optimierung 3. Oben rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben $\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Optimierung 3

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ PT1	131 ± 1	57 ± 2
$\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ PT2	148 ± 1	57 ± 2

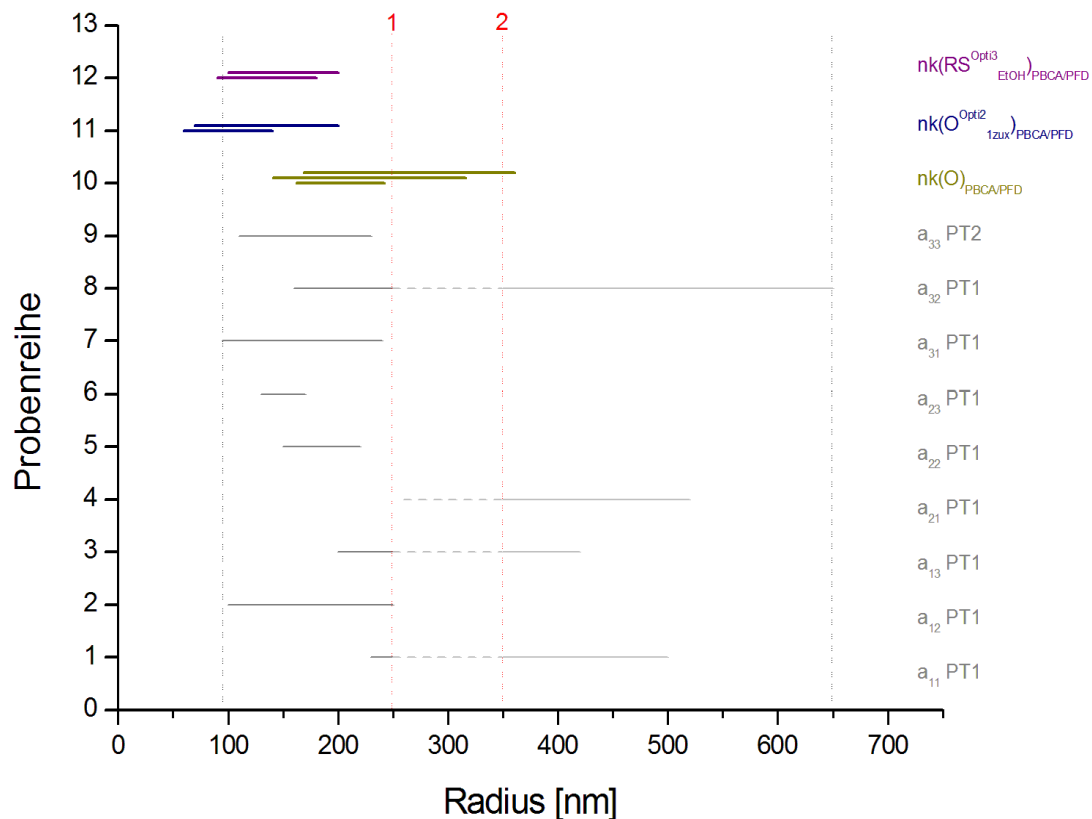


Abbildung 4.50: Auftragung der Hauptverteilungsbreiten aller optimierten Proben $nk(O^{\text{Opti1}}_{12ux})_{\text{PBCA/PFD}}$, $nk(O^{\text{Opti2}}_{12ux})_{\text{PBCA/PFD}}$ und $nk(RS^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ im Vergleich mit den Verteilungsbreiten aus den Messungen der Proben der Muttersynthese $nk(O)_{\text{PBCA/PFD}}$ mit den Begrenzungsmarkierungen der Optimierung 1 (vgl. Abbildung 4.30 in Kapitel 4.3.1.1).

4.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion der AFM-Messungen der Optimierung 3

Mittels der AFM-Untersuchung können einheitlich große und rundliche Partikel mit glatter Oberfläche detektiert werden (siehe Abbildung 4.51). Allerdings handelt es sich dabei um sehr kleine und verhältnismäßig flache Teilchen mit einer Höhe von ungefähr 20 nm und einer Breite von etwas über 400 nm . Nach dem Einkerbungsexperiment kann eine Faltung oder eine Einkerbung beobachtet werden, die über die gesamte Partikellänge verläuft und in der Cross-Section mit einer Tiefe von nur ungefähr 3 nm angegeben wird. Ein Unterschied in der Partikelhöhe und/oder -breite ist bei dieser Teilchendimension schwer festzustellen und beträgt allenfalls wenige Nanometer. Auch anhand des Kraftkurvenverlaufs ist zu erkennen, dass es sich um relativ flache Partikel handeln muss (siehe Abbildung 4.52). Die Passage der Kerndurchdringung ist nur vage zu vermuten. Die AFM-Spitze scheint nahezu unmittelbar nach der Berührung mit der Partikeloberfläche auf den harten Untergrund des Substrates zu treffen, was sich in einem fast senkrechten Anstieg der Kraft widerspiegelt.

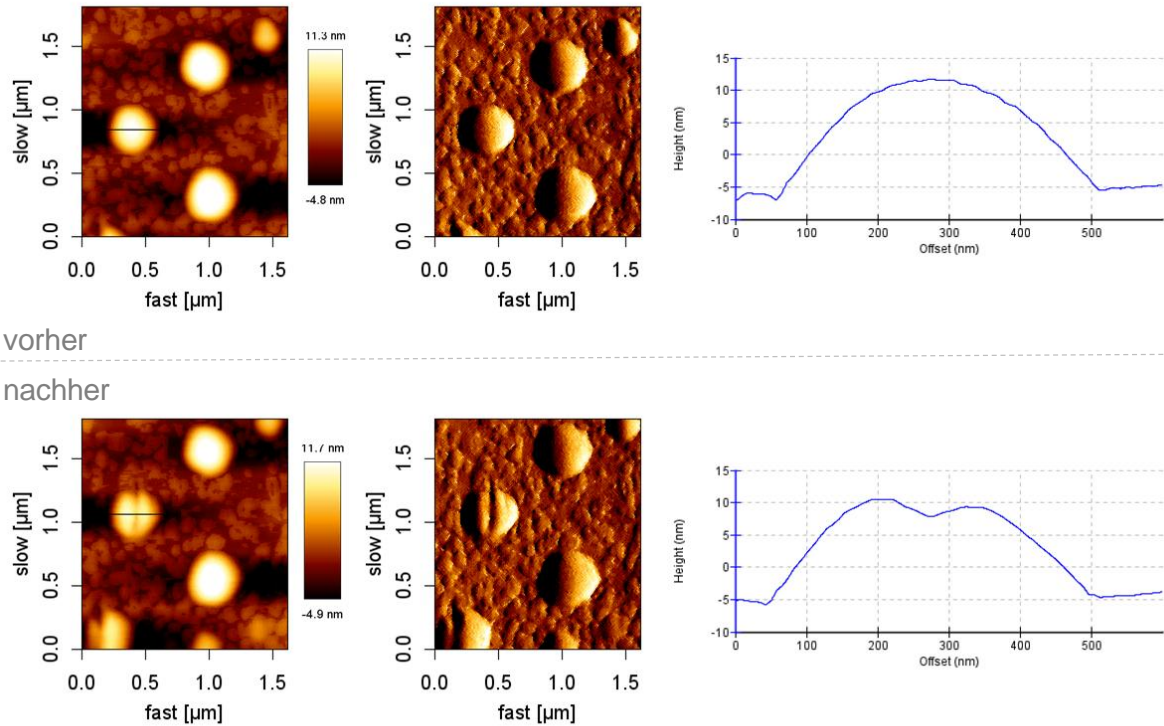


Abbildung 4.51: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Einkerbungsversuchs an der Probe $\text{nk(RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}}\text{)PBCA/PFD}$. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

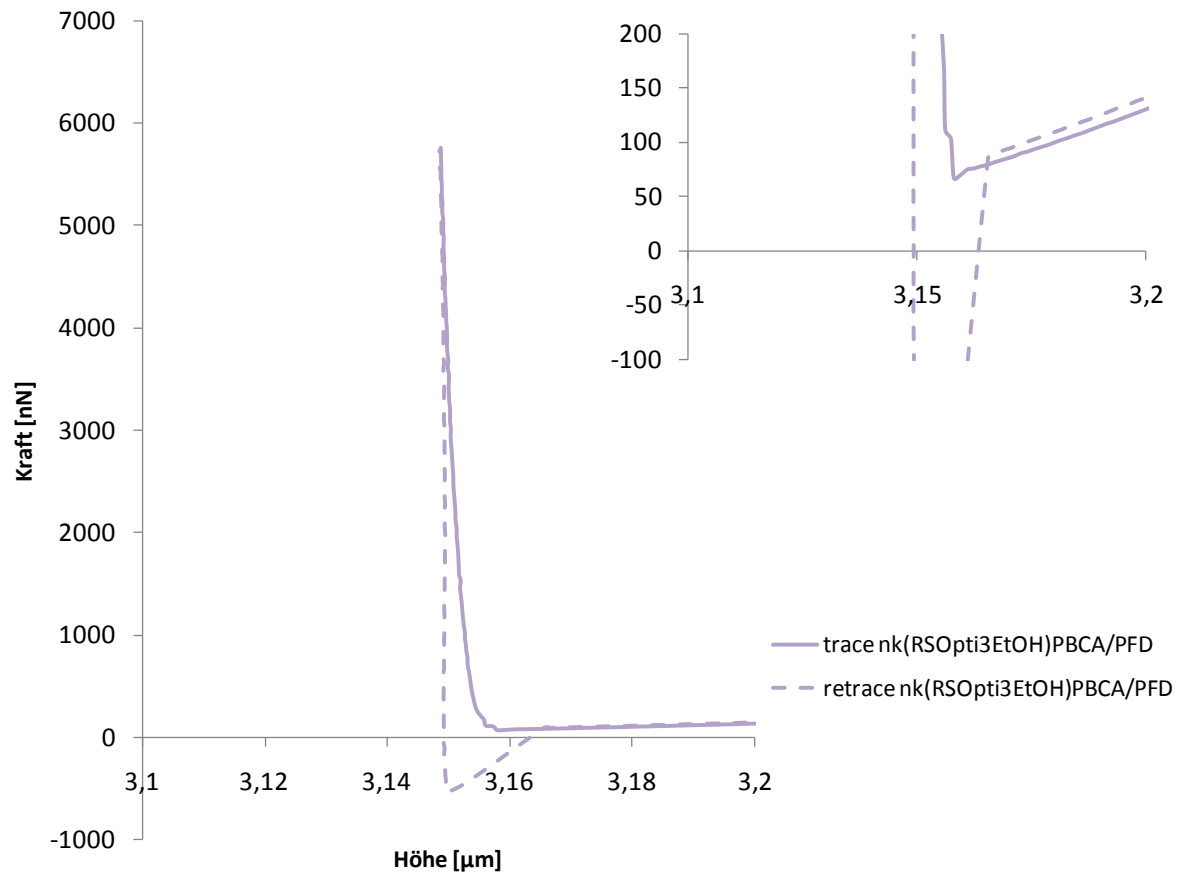


Abbildung 4.52: Kraft-Weg-Diagramm aus dem Einkerbungsexperiment an der Probe $\text{nk(RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}}\text{)PBCA/PFD}$ der Optimierung 3.

Zusammenfassend zeigt sich für die letzten beiden Optimierungsversuche die Notwendigkeit weiterer Experimente und Untersuchungen, um eindeutige Aussagen über ihre Effizienz treffen zu können. Der Kapselcharakter der Partikel der Probe $\text{nk}(\text{RS}^{\text{Opti3}}_{\text{EtOH}})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Optimierung 3 kann per AFM nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen werden. In den Particle Tracking-Messungen ergeben sich keine auffälligen Abweichungen in den Partikelgrößen. Die ermittelten Größenverteilungen liegen im Größenbereich der Partikel der Proben der Optimierung 2 und sind damit im Durchschnitt etwas kleiner als die Nanokapseln, die mittels der Standardsynthese erzeugt werden können. Für die Optimierung 2 wäre es interessant, die Standardsynthese unter Beibehaltung der Standardvolumina von PFD und Lösemittelgemisch an die optimierte Variante anzupassen, um die Theorie von S. A. Vitale und J. L. Katz [90] überprüfen zu können und ein tieferes Verständnis vom Ouzo-Effekt für weitere Forschungsarbeiten und zukünftigen Optimierungsbedarf zu erlangen.

4.4 Kernresonanzspektroskopie zur Untersuchung der Gasaufnahme von Nanokapseln

Zur Untersuchung der Fähigkeit zur Sauerstoffaufnahme und -abgabe der optimierten perfluordecalingefüllten Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln werden kernresonanzspektroskopische Messungen angestellt. Da das häufigste Sauerstoffisotop (^{16}O) einen Kernspin von 0 besitzt und damit NMR-inaktiv ist, kann der Sauerstoffanteil mittels der Kernresonanzspektroskopie nur indirekt bestimmt werden. Hierzu wird der Umstand genutzt, dass sich die chemische Umgebung der Fluorkerne in Perfluordecalin in Gegenwart von Sauerstoff bzw. Fremdmolekülen oder -atomen im Allgemeinen verändert. Daraus ergibt sich ein messbarer Zusammenhang zwischen der zugesetzten Gasmenge und der chemischen Verschiebung der zu beobachtenden Signale sowie der Spin-Gitter-Relaxationszeit. Die Korrelationen werden zunächst an reinem Perfluordecalin im Sinne einer Kalibrationskurve überprüft, um im Anschluss einen Vergleich mit Messungen an Kapselproben anzustellen. Die jeweilige Messprobe wird dazu mit unterschiedlichen Sauerstoff/Stickstoffgemischen begast (für eine detailliertere Beschreibung der Versuchsbedingungen sei auf die entsprechenden Ausführungen in Kapitel 3.5.3.4 verwiesen). Zusätzlich werden sogenannte Gaskinetikuntersuchungen in Form von Gasaustausch- bzw. Gassättigungsexperimenten an Perfluordecalin und Kapselproben durchgeführt, indem eine alternierende Begasung von Stickstoff und Sauerstoff während der Messung der Signalverschiebung stattfindet.

Bei dem zu beobachtenden Signal handelt es sich um den Peak bei 191,39 ppm im ^{19}F -NMR-Absorptionsspektrum, aufgenommen an reinem, unbegastem Perfluordecalin (siehe Abbildung 4.53).

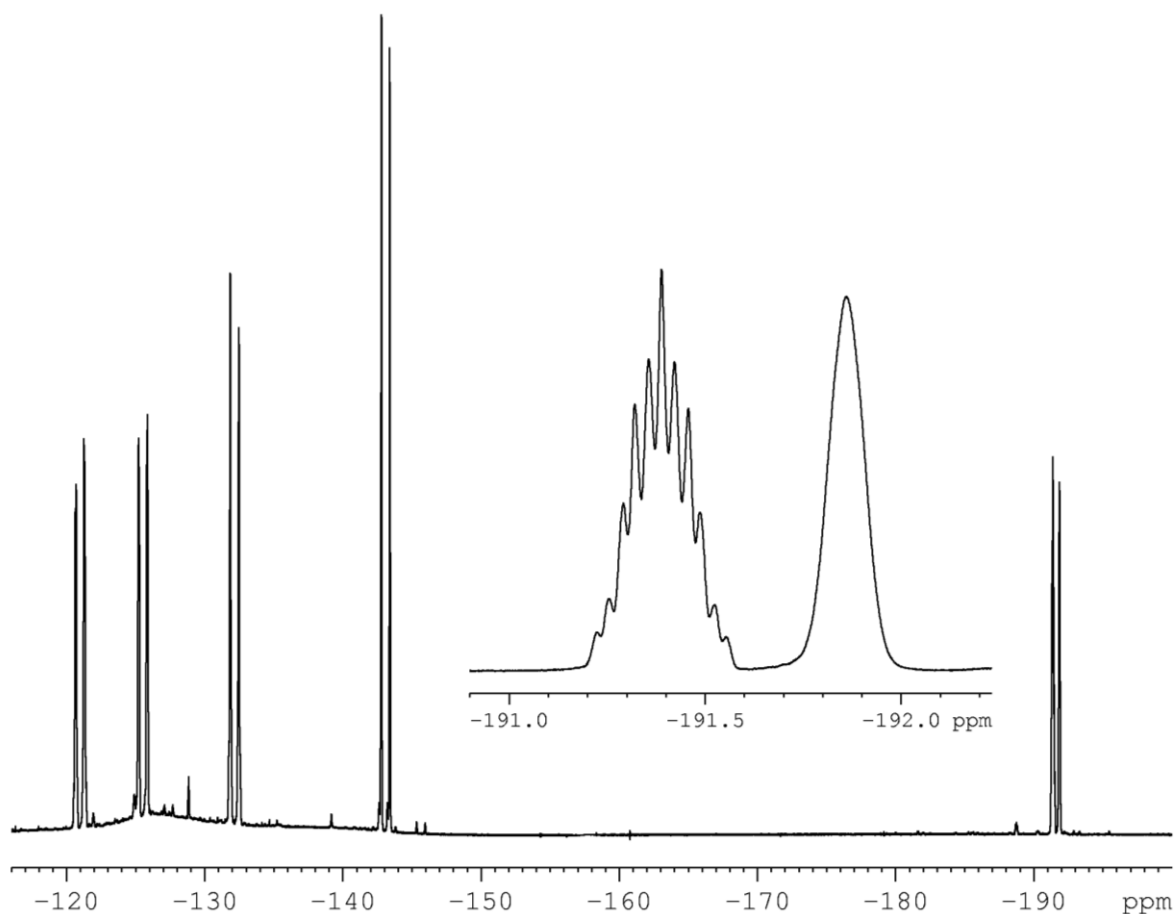


Abbildung 4.53: ^{19}F -NMR-Absorptionsspektrum von Perfluorodecalin (rein: *cis/trans*-Gemisch), unbegast.

Das Spektrum zeigt die Signale der verschiedenen Fluoratome im Perfluorodecalinmolekül. Im oberen *ppm*-Bereich (zwischen -145 und -120 *ppm*) liegen die Resonanzfrequenzen der äußeren Fluoratome des Ringgerüsts, F1 bis F8 (siehe Abbildung 4.54). Die beiden Signale im unteren *ppm*-Bereich, zwischen -193 und -191 *ppm*, können den äquivalenten Brückenkopf-Fluoratomen an den Positionen 9 und 10 in Abbildung 4.54 zugeordnet werden und sind auf die *cis/trans*-Isomerie des PFD-Moleküls zurückzuführen. Die unterschiedliche Breite der beiden Peaks können durch Unterschiede in der konformellen Dynamik der isomeren Verbindungen erklärt werden. Während das *cis*-Isomer einer schnellen konformellen Gleichgewichtsdynamik folgt, verharrt *trans*-Perfluorodecalin bei Raumtemperatur in einer relativ starren Konformation.¹⁵¹ Mit einer chemischen Verschiebung von -191,39 *ppm* soll dieser Peak damit als Referenzsignal für alle weiteren Messungen in Bezug auf die Abhängigkeit der Resonanzfrequenz vom Sauerstoffgehalt begasteter Perfluorodecalin- und perfluorodecalinhaltiger Kapselproben dienen.

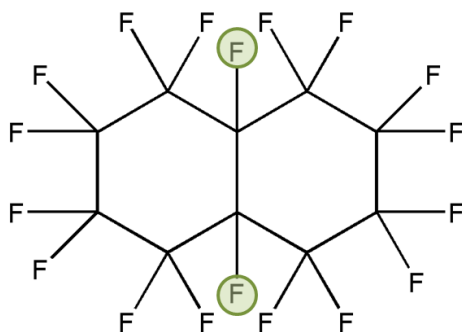


Abbildung 4.54: Strukturformel von Perfluorodecalin. Die beiden Brückenkopf-Fluoratome sind grün markiert.

Kalibrierung mit reinem, begasten Perfluorodecalin

Für die Anfertigung der Kalibrierkurven werden Perfluorodecalinproben mit unterschiedlichen Sauerstoffgehalten hergestellt, indem die Proben über eine Kapillare mit individuellen Stickstoff-/Sauerstoffgemischen begast werden. Die Zusammensetzung der Gasmischung sowie die jeweiligen Messwerte für die chemische Verschiebung und die T_1 -Relaxationszeit sind in Tabelle 4.10 aufgeführt.

Tabelle 4.10: Ergebnisse der kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen zur Überprüfung der Gasaufnahme

Luftdruck [hPa]	pO_2 (Mischung) [hPa]	pN_2 (Mischung) [hPa]	cO_2 [Vol-%]	T_1 [s]*	$\Delta\delta$ zu Signal unter N_2 [Hz]	pO_2 [hPa]**
994	-	994	0	3,82	0	0
1016	55	2558	2,10	3,34	3,95	21,34
1013	102	2464	3,98	2,98	3,81	40,32
1014	223	2401	8,49	2,37	15,06	86,00
1014	402	2274	15,02	1,82	21,27	152,15
1016	610	2064	22,81	1,47	37,32	231,75
1017	1004	1673	37,50	1,05	62,26	381,38
1015	1370	1299	51,33	0,81	85,04	520,85
1007	1723	984	63,65	0,68	111,63	640,96
1006	2200	522	80,82	0,57	135,11	813,05
1005	2600	-	100	0,48	164,90	1005

* -191,39 ppm

** in abgeschmolzener Probe

Eine grafische Verdeutlichung der Abhängigkeit der Verschiebung und der T_1 -Relaxationszeit vom Sauerstoffgehalt zeigen die nachfolgenden Abbildungen 4.55 und 4.56. Beide Parameter weisen einen annähernd linearen Bezug zum Sauerstoffgehalt bzw. -partialdruck auf.

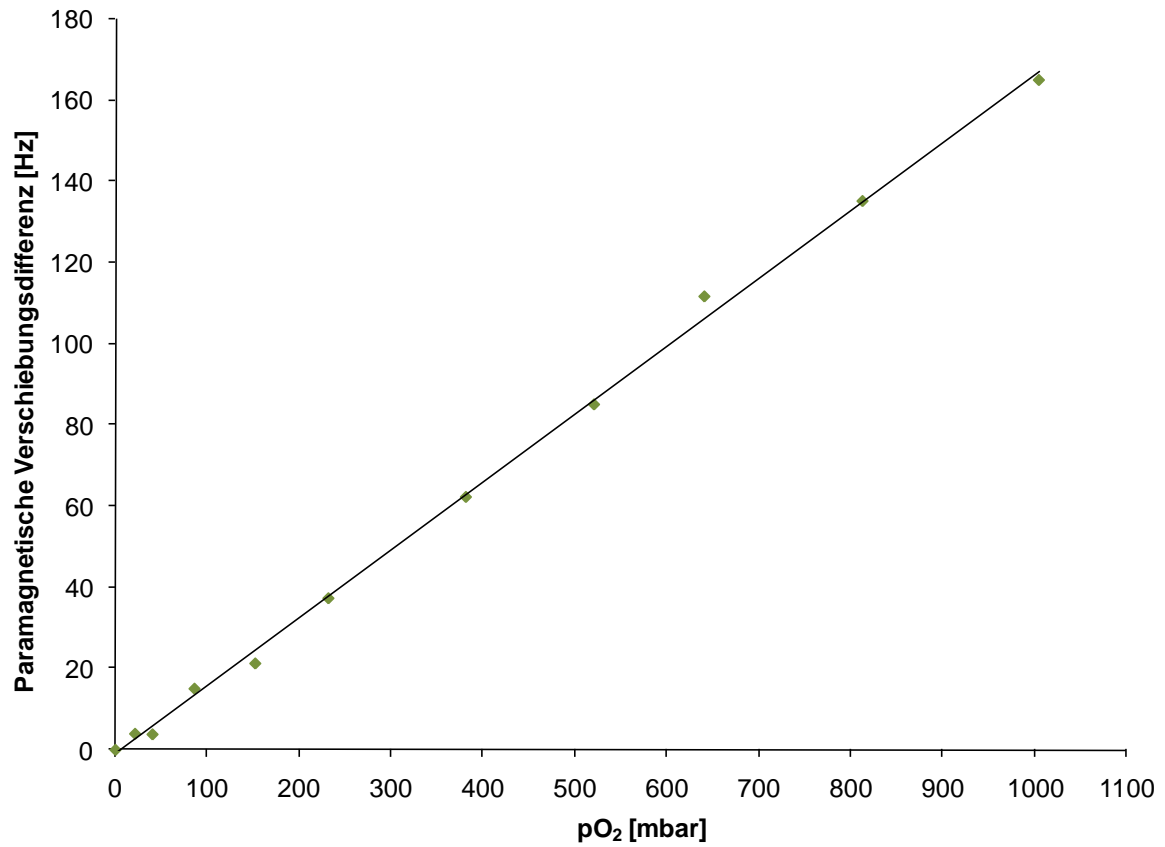


Abbildung 4.55: Paramagnetische Verschiebungsdifferenz von reinem Perfluordecalin begast mit Sauerstoff als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks.

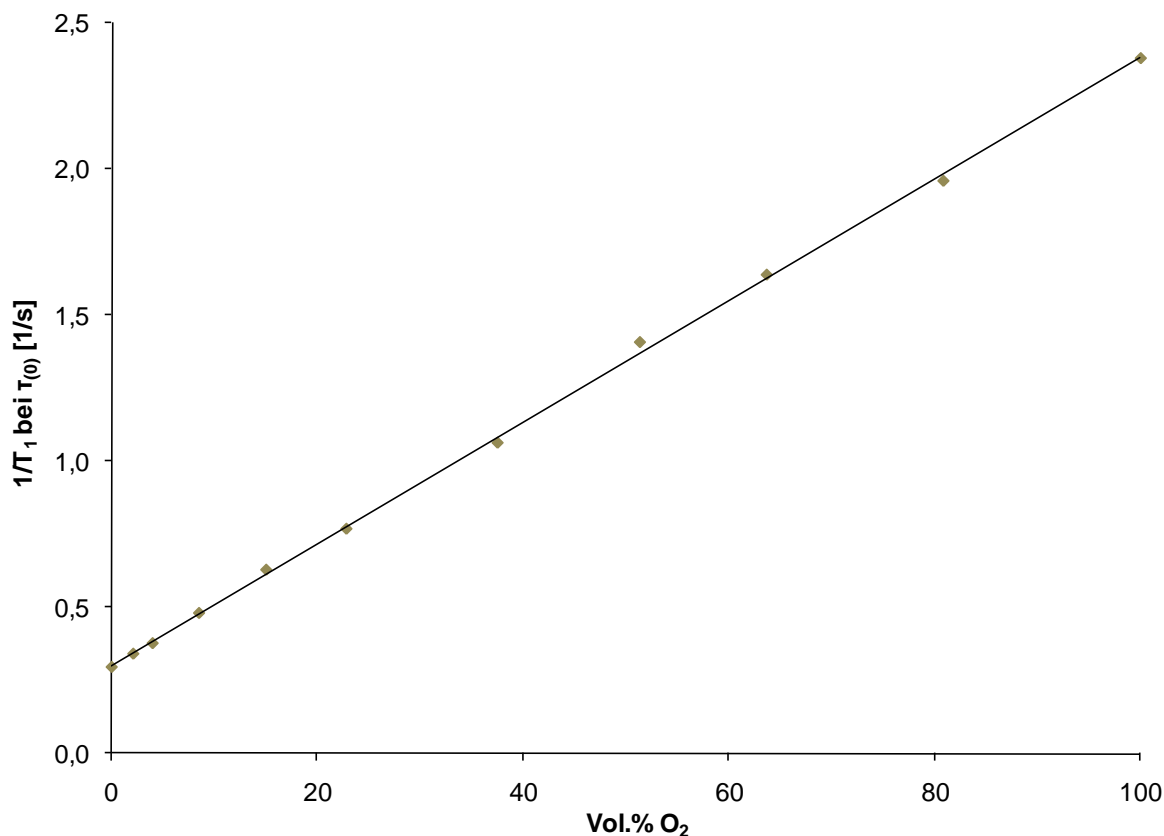


Abbildung 4.56: Reziproker Wert der Spin-Gitter-Relaxationszeit des ^{19}F -Signals von reinem Perfluor-decalin begast mit Sauerstoff als Funktion des Sauerstoffgehalts.

NMR-Experimente an Kapselproben

Auch bei den Messungen begaster Kapseldispersionen, die nach der Synthesestrategie $\text{nk(LV)}_{\text{PLGA/PFD}}$ hergestellt wurden, kann ein linearer Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung des *trans*- ^{19}F -Signals des eingekapselten Perfluordecals und der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 und dem Sauerstoffgehalt bzw. -partialdruck beobachtet werden (siehe Abbildungen 4.57 und 4.58).

Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der entsprechenden Messungen an reinem Perfluordecalin zeigt jedoch, dass eine Übertragung dieser Werte auf die Parameter für Perfluordecalin im eingekapselten Zustand nicht realistisch ist. Zwar ergeben sich für die T_1 -Werte bei ähnlicher Geradensteigung nur geringfügige Abweichungen, die Werte für die chemische Verschiebung unterscheiden sich jedoch deutlich von den jeweiligen Ergebnissen reinen Perfluordecals. Vermutlich ist der Einfluss der Kapselwand auf die chemische Umgebung der Fluorkerne in eingeschlossenen Perfluordecalin zu groß, als dass er zu vernachlässigen ist.

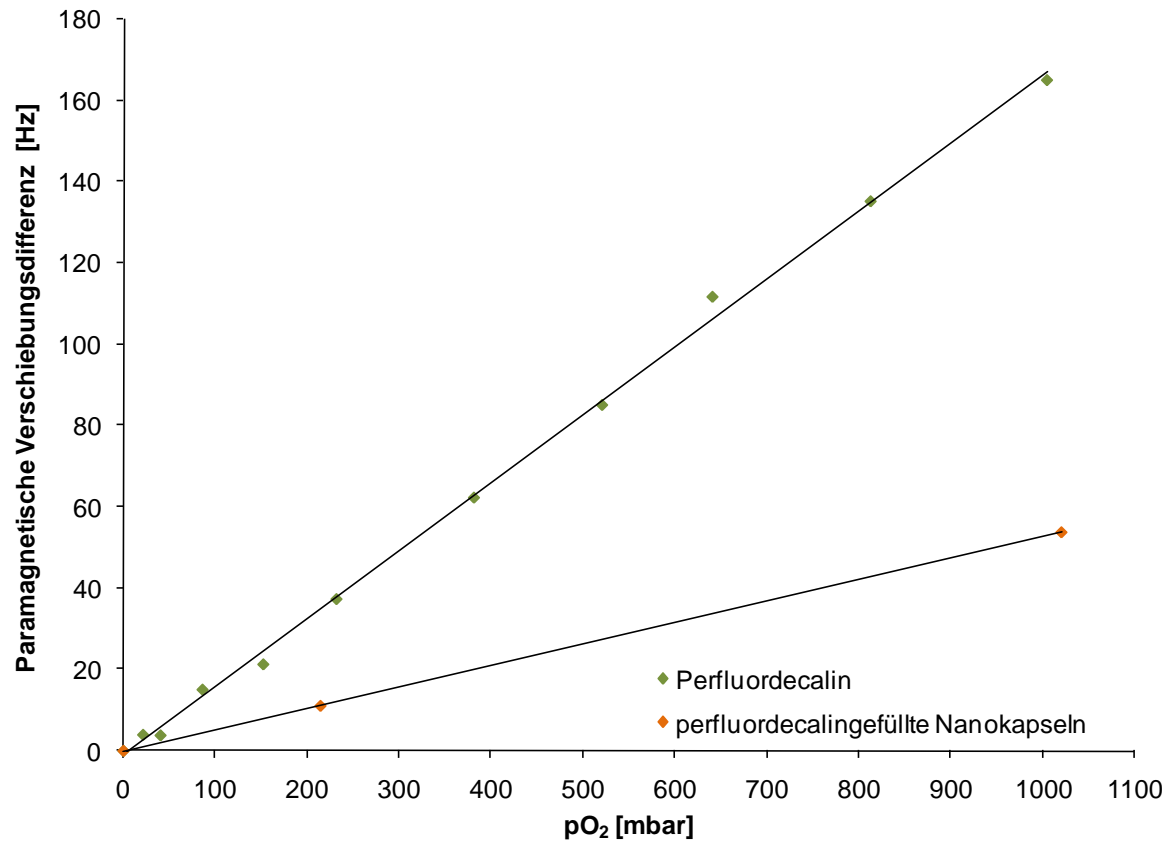


Abbildung 4.57: Vergleich der paramagnetischen Verschiebungsdifferenz von reinem (grün) und eingekapseltem (orange) Perfluorodecalin begast mit Sauerstoff als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks.

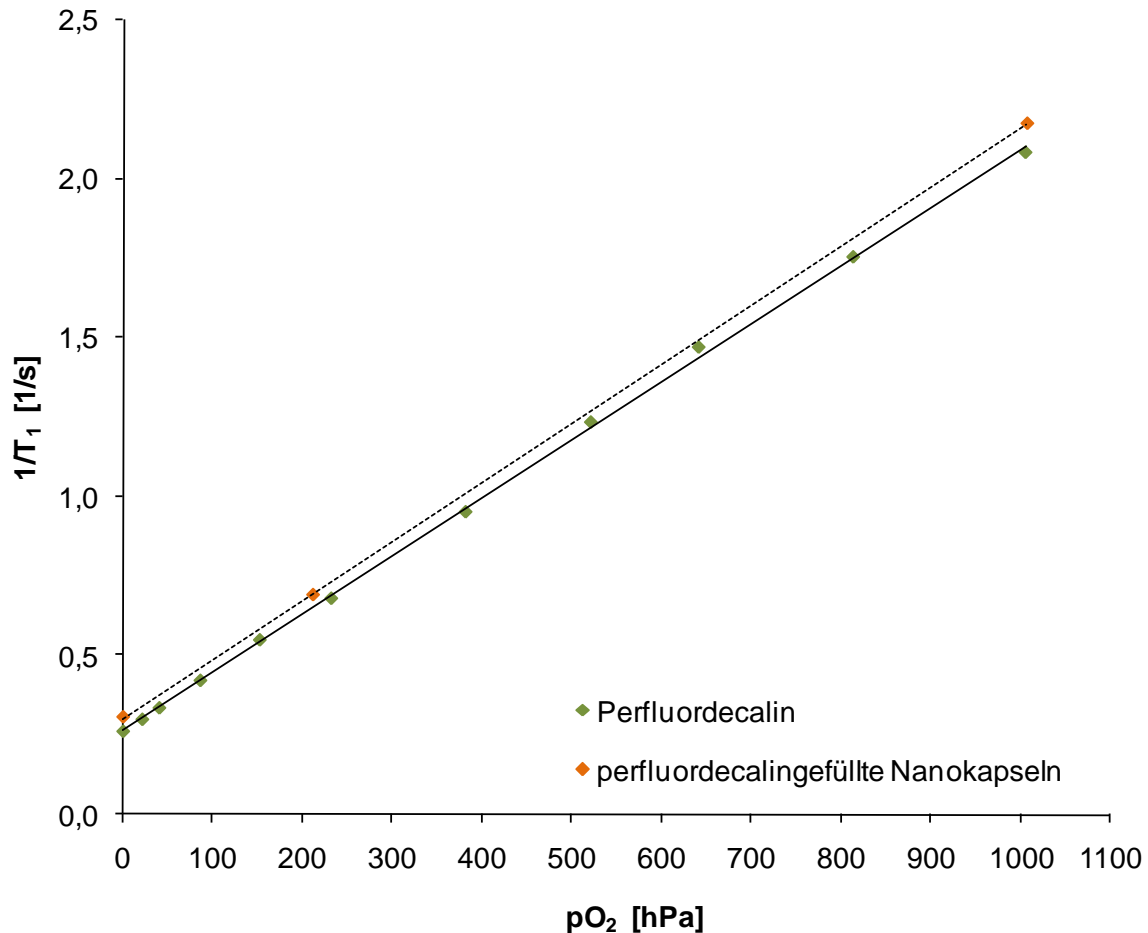


Abbildung 4.58: Vergleich der reziproken Spin-Gitter-Relaxationszeiten von reinem (grün) und eingekapseltem (orange) Perfluorodecalin begast mit Sauerstoff als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks.

Gasaustauschexperimente – Erstellen von Sauerstoffsättigungsdiagrammen

Mittels eines sogenannten Gasaustauschexperiments ist es möglich, den Sauerstoffgehalt in den perfluorodecalingefüllten Nanokapseln mittels wechselnder Gasatmosphäre zeitabhängig zu verfolgen. Dazu wird die Probe zunächst mit reinem Stickstoff begast. Dann wird ein Atmosphärenwechsel durch Stoppen der Stickstoffzufuhr und Einleiten von Sauerstoff vorgenommen. Anschließend erfolgt ein Wechsel zurück zur Stickstoffbegasung und so weiter. Dabei werden im 20-Sekundentakt ^{19}F -Spektren aufgenommen, um die chemische Verschiebung in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration zu bestimmen. Solch ein Atmosphärenzyklus ist als zeitlicher Verlauf der paramagnetischen Verschiebung beispielhaft in Abbildung 4.59 dargestellt.

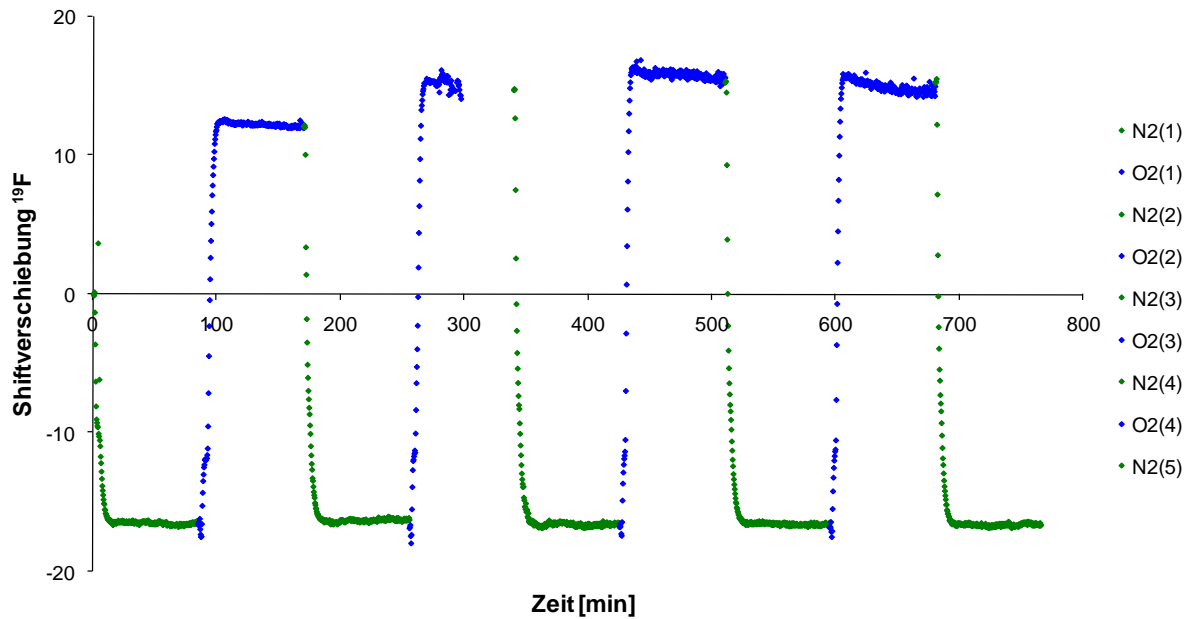


Abbildung 4.59: Gasaustausch an perfluorodecalingefüllten PBCA-Nanokapseln. Die unterschiedlichen Gasatmosphären sind farblich gekennzeichnet, wobei die Aufnahme von Stickstoff grün und die Aufnahme von Sauerstoff blau markiert ist.

Anhand des Diagramms ist zu erkennen, dass eine reversible Gassättigung von Perfluorodecalin in Kapseln prinzipiell möglich ist. Hierbei benötigt das System für einen Sättigungswechsel von Stickstoff (grüne Kurve) zu Sauerstoff (blaue Kurve) im Durchschnitt rund 12 Minuten, um die Gleichgewichtslage der neuen Atmosphäre zu erreichen. Für einen umgekehrten Wechsel – von Sauerstoff zu Stickstoff – ist eine Wartezeit von ca. 10 Minuten erforderlich. Dies liegt vor allem daran, dass das jeweilige Gas aus den Gasblasen in die flüssige Phase übertreten muss, was über eine verhältnismäßig kleine Fläche geschieht. Die Aufnahme in die Kapseln erfolgt dann in einem zweiten Schritt und verläuft vermutlich sehr viel schneller, da die Phasengrenzfläche im Verhältnis zum Phasenvolumen hier extrem groß ist.

Das Gasaustauschverhalten von eingeschlossenem Perfluorodecalin ist vergleichbar mit dem des freien Perfluorcarbons. Abbildung 4.60 zeigt den Verlauf des gleichen Sättigungsexperiments an reinem PFD. Auch hier kann das Umschalten der Atmosphäre aufgrund der Abhängigkeit der Shiftverschiebung von der Sauerstoffkonzentration zeitlich verfolgt werden. Allerdings zeigt sich in diesem Fall eine deutlich schnellere Einstellung der Gleichgewichtsbedingungen für den Wechsel von Stickstoff zu Sauerstoff mit knapp drei bis vier Minuten. Der Austausch von Sauerstoff gegen Stickstoff dauert wie beim Versuch mit eingekapseltem Perfluorodecalin ca. 10 Minuten. Mit Hilfe der Kalibrationskurve für die Signalverschiebung kann die Sauerstoffsättigung für das reine Perfluorodecalin prozentual umgerechnet und an der y-Achse abgelesen werden. Auf diese Weise erhält man sowohl für die Sauerstoff- als auch für die Stickstoffsättigung von reinem PFD einen Wert von nahezu 85%.

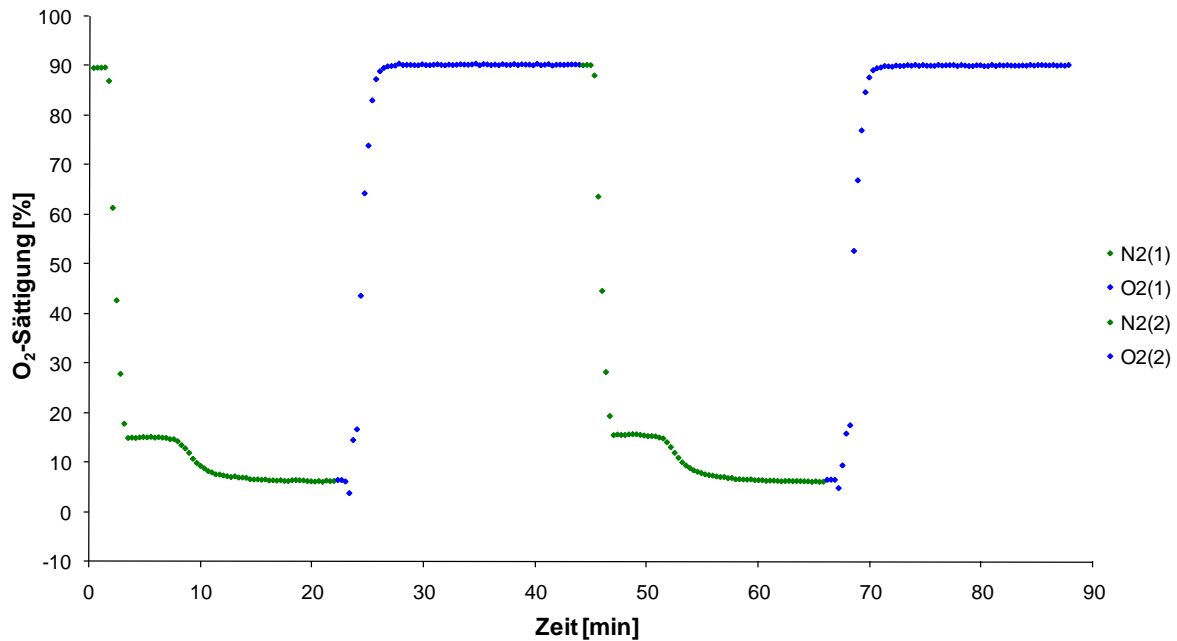


Abbildung 4.60: Gasaustausch an reinem Perfluorodecalin. Die unterschiedlichen Gasatmosphären sind farblich gekennzeichnet, wobei die Aufnahme von Stickstoff grün und die Aufnahme von Sauerstoff blau markiert ist. Mit Hilfe der Kalibrationskurve gelingt es über die Shiftverschiebung den prozentualen Anteil der Gassättigung zu ermitteln (y-Achse).

Zusammenfassend ist für diesen Abschnitt festzuhalten, dass es möglich ist, Perfluorodecalin reversibel mit Sauerstoff zu beladen. Gleiches gilt für Perfluorodecalin im eingekapselten Zustand. Daraus ist zu schließen, dass die Kapselwand permeabel ist und einen Gasaustausch zulässt. Die Sauerstoffsättigung ist im Vergleich zu reinem Perfluorodecalin durch eine etwas geringere Sättigungsgeschwindigkeit gekennzeichnet, vermutlich weil der Stickstoff aufgrund seiner niedrigeren Molmasse mit etwas höherer Rate durch die Grenzflächen der Gasblasen diffundiert. Mittels einer Kalibrierkurve gelingt es, die Veränderung der chemischen Verschiebung des Fluorsignals während der Gasaufnahme in eine korrespondierende Sauerstoffmenge zu übertragen. Die Kalibrationskurve des reinen Perfluorodecalins ist allerdings nicht auf die Kapseldispersion übertragbar.

4.5 Leberperfusion

Um Informationen über die physiologische Eignung der Nanokapseln zu erlangen, werden Perfusionstests an einer isolierten Rattenleber vorgenommen. Dazu wird eine gepufferte Kapseldispersion durch ein extrakorporales Zirkulationssystem geleitet (siehe Abbildung 3.27 in Kapitel 3.5.4). Die Untersuchungen finden an der Leber statt, da sie, wie auch die Niere, eine wesentliche Rolle bei der Eliminierung von Fremdkörpern im Organismus übernimmt. Zudem kann die Arbeitsgruppe der physiologischen Chemie des Universitätsklinikums Essen auf einen großen Erfahrungsschatz aus früheren Leberexperimenten zurückgreifen und ist

damit für die praktische Umsetzung der Versuche und eine fachgemäße Beurteilung der Ergebnisse bestens aufgestellt.

Es werden vier Experimente durchgeführt. Die Präparation der Kapseldispersionen erfolgt jeweils entsprechend der Optimierung $nk(O^{Opt1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$, so dass sich daraus die Proben $nk(O^{Opt1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$ LPI, LPII, LPIII und LPIV ergeben. Mit jeder Dispersion wird ein Perfusionsdurchlauf mit einer Maximaldauer von 120 Minuten gefahren (Ausnahme: die Dauer des vierten Perfusionsversuchs beträgt nur 75 Minuten, da der Durchlauf aus technischen Gründen gestoppt werden musste). Während eines Durchlaufs werden medizinisch-biologisch relevante Parameter aufgezeichnet, die Aufschluss über eine prinzipielle Beeinträchtigung der Leberfunktionen durch die Konfrontation mit den Nanokapseln geben sollen. Hierbei ergibt sich zum Einen die Frage nach der Biokompatibilität der Nanokapseln als auch nach dem Grad der Leberoxygenierung durch die potenziellen Sauerstoffträger. Letztere kann, um dies vorwegzunehmen, zum aktuellen Zeitpunkt, im Rahmen jener ersten Untersuchungen, nicht beantwortet werden. Der interessierte Leser sei an dieser Stelle auf anstehende Folgeprojekte der kooperierenden Arbeitsgruppen verwiesen.

4.5.1 Ergebnisse und Diskussion der medizinischen Analyse

Zur medizinischen Analyse gehören neben der Kontrolle physikalischer Versuchsparameter wie dem pH-Wert, dem Perfusionsdruck und dem Sauerstoffpartialdruck, Messungen der Elektrolytkonzentration (in erster Linie die Konzentration der Kaliumionen $c(K^+)$, aber auch $c(Na^+)$, $c(Ca^{2+})$ und $c(Cl^-)$), der Lactat- und Glucosewerte sowie der Enzymproduktion von Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Lactat-Dehydrogenase (LDH). Die aus allen vier Perfusionsdurchläufen durchschnittlich ermittelten Werte der gemessenen Parameter werden sowohl für die Kapselperfusion als auch für die kapselfreie Perfusion, mittels der reinen Pufferlösung als Kontrolle, gemeinsam in Fehlerbalkendiagramme übertragen. Insgesamt sind aus medizinischer Sicht, anhand der erhaltenen Messergebnisse, soweit keine gravierenden Abweichungen von empirischen Richtwerten zu verzeichnen. Der pH-Wert sinkt im Verlauf des Versuches bei beiden Perfusionsmedien geringfügig, liegt aber im Toleranzbereich (vgl. Abbildung 6.32 im Anhang). Der Perfusionsdruck bleibt unter Verwendung der Kapseldispersionen relativ konstant. Bei der Kontrolle kann nach ungefähr 60 Minuten Perfusion ein kleiner Einbruch der Druckwerte registriert werden, die sich danach aber wieder auf einen konstanten Wert einpendeln (siehe Abbildung 6.33 im Anhang). Nachdem das Medium die Leber passiert, fällt der Sauerstoffpartialdruck drastisch ab (vgl. pO_2 vor und nach der Leber in den Abbildungen 6.34 und 6.35 im Anhang). Der Druckverlust wird bei den eingeleiteten Kapseldispersionen allerdings von einer starken Streuung begleitet. Eine Änderung der Kaliumionenkonzentration kann Rückschlüsse über

eine Schädigung der Leberzellen geben. Steigt die Konzentration an K^+ im Medium im Verlauf der Perfusion deutlich an, ist davon auszugehen, dass eine Zerstörung der Zellmembranen erfolgt ist. Wie in Abbildung 4.61 jedoch zu erkennen ist, zeigen sich sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Kapseldispersionsdurchläufen keine wesentlichen Abweichungen in den gemessenen Konzentrationswerten. Die Leberzellen scheinen intakt zu bleiben. Ähnliche Konstanz zeigen die Messwerte der Calcium-, Natrium- und Chloridionenanalyse. Die Ergebnisse sind im Anhang in den Abbildungen 6.36 bis 6.38 aufgeführt.

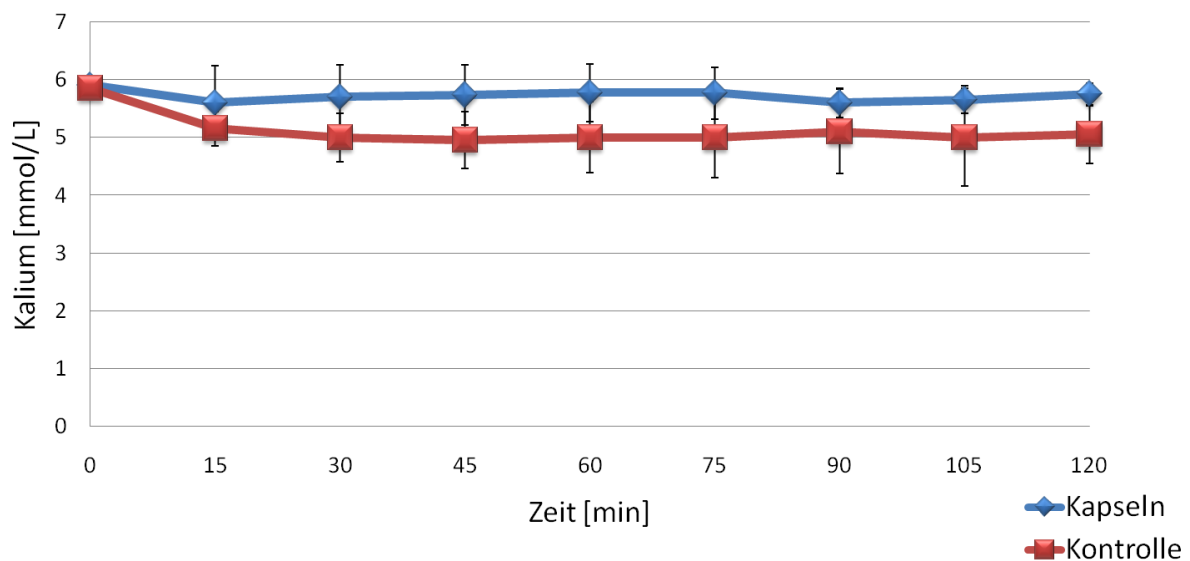


Abbildung 4.61: Zeitlicher Verlauf der Kaliumionenkonzentration während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

Der Glucosegehalt steigt mit der Zeit sowohl bei den Kapseln- als auch bei den Kontrollproben an (vgl. Abbildung 4.62). Zu erklären ist dies durch eine Reaktion der Leber auf die Höhe des Blutzuckerspiegels. Ist die Blutzuckerkonzentration zu gering, gibt die Leber ihren Glycogenspeicher frei und führt dem Blut Glucose zu. Da in beiden Perfusionsmedien, zumindest zu Beginn, keine Zuckermoleküle vorhanden sind, gibt die Leber Glucose ab, um dem Mangel entgegenzuwirken.

Ergebnisse und Diskussion

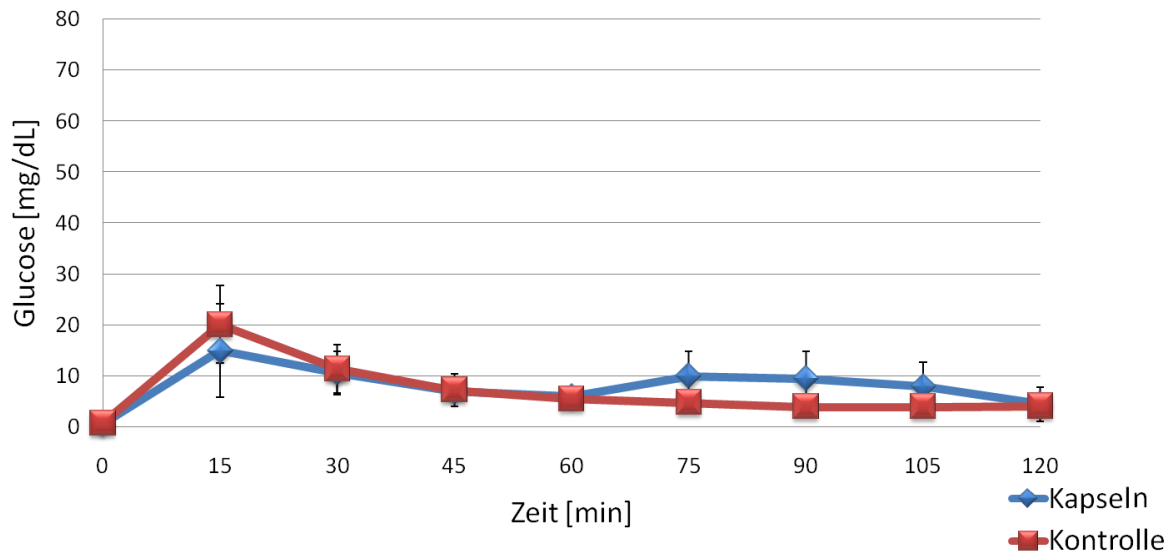


Abbildung 4.62: Zeitlicher Verlauf der Glucosekonzentration während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

Ein vergleichbares Ergebnis lässt sich bei der Überprüfung der Lactatwerte beobachten. Auch hier kommt es in beiden Fällen zu einem Konzentrationsanstieg (vgl. Abbildung 6.39 im Anhang). Allerdings ist eine Analyse des Lactatgehalts ohne eine parallele Messung der Pyruvatkonzentration nicht zuverlässig und damit nicht aussagekräftig. Allgemein kann jedoch eine verstärkte Lactatproduktion auf einen anaeroben bzw. hypoxischen Zustand der Leber hindeuten. Ähnlich bedenklich ist eine deutliche Zunahme der Enzymkonzentration. Hierzu ist bei allen gemessenen Enzymtypen ein wesentlich stärkerer Anstieg bei den Kontrolldurchläufen mit reiner Pufferlösung zu verzeichnen als bei den Kapselproben, wie es in den folgenden Abbildungen 4.63 bis 4.65 zu erkennen ist.

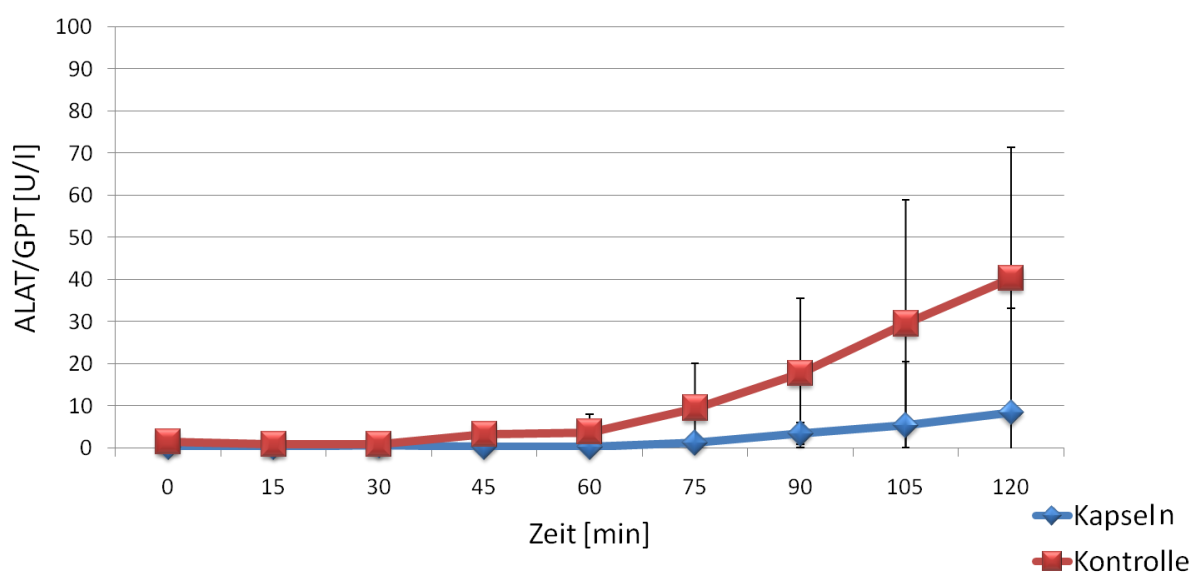


Abbildung 4.63: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Alanin-Aminotransferase während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

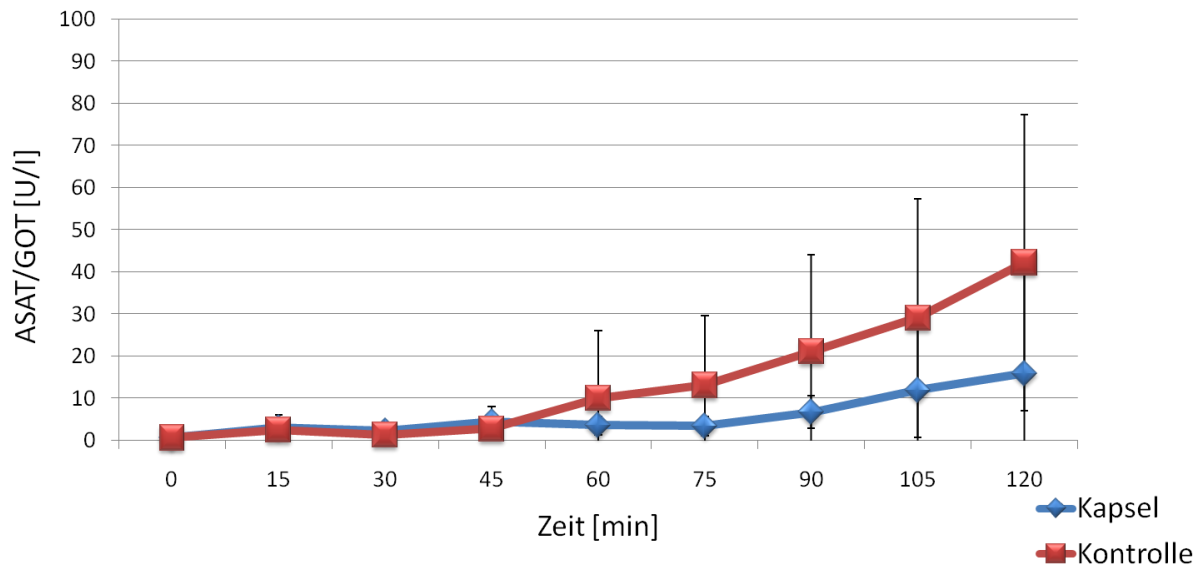


Abbildung 4.64: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Aspartat-Aminotransferase während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

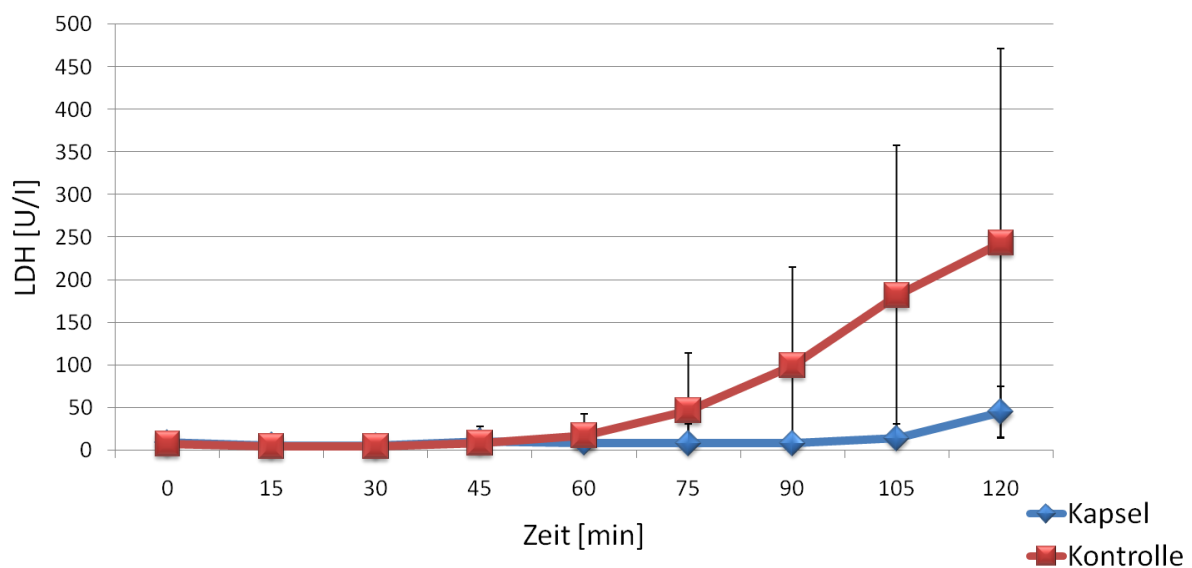


Abbildung 4.65: Zeitlicher Verlauf der Konzentration von Lactat-Dehydrogenase während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

Damit sei bis hierher zunächst festzuhalten, dass sich die Kapseldispersionen insofern als biokompatibel erweisen, als dass es im Zuge der ersten, oberflächlichen Untersuchungen zu keinen schwerwiegenden Komplikationen hinsichtlich einer extremen Einschränkung der Leberfunktionen gekommen ist. Die Partikeldispersionen zeigen keine Verschlechterungen der Werte im Vergleich zu den Kontrollproben auf, vielmehr demonstrieren die Untersuchungen der Enzymaktivitäten eine effektive Verbesserung der Resultate gegenüber der Verwendung reiner Krebs-Henseleit-Pufferlösung und geben damit Grund zu der Annahme, dass eine Perfusion mit den hiesigen Nanokapseln generell praktikabel zu sein scheint.

Neben den durch die Mediziner erhaltenen Ergebnissen werden das Particle Tracking und die Kernresonanzspektroskopie als physikalisch-chemische Untersuchungsverfahren zu Rate gezogen, um eventuelle Veränderungen der Kapselproben durch die Leberperfusion aufzudecken. Zu diesem Zweck werden während eines Durchlaufs nach festgelegten Zeitabschnitten (30, 60 und 90 Minuten) bis zu drei Proben entnommen. Zusammen mit der Probe nach 0 Minuten Perfusion (Originalprobe mit Pufferlösung versetzt, Dispersion im Vorratsbehälter) als Referenz und der resultierenden Probe nach Ende des Experiments erhält man für die analytischen Untersuchungen fünf Proben in Form einer Probenreihe. Die Ausnahme bildet Leberperfusion IV. Hier musste der Durchlauf aus technischen Gründen nach 75 Minuten abgebrochen werden, so dass lediglich vier Proben für die spätere Auswertung zur Verfügung stehen.

4.5.2 Ergebnisse und Diskussion der Ergebnisse des Particle Tracking

Mit Hilfe der Particle Tracking-Messungen gilt es nun zu überprüfen, ob und möglicherweise inwieweit sich durch den Perfusionvorgang an sich sowie durch die Dauer der Perfusion Veränderungen bezüglich der Partikelkonzentration und der Partikelgrößenverteilung ergeben haben. Konkreter: Gehen während der Perfusion potentielle Sauerstoffträger verloren, indem sie vom System (Leber/Zirkulationsinstrumente) aufgenommen und/oder durch die Beanspruchung verändert (Aggregation) oder beschädigt bzw. zerstört werden? Und, wenn ja, findet dabei eine Selektion der Partikelgröße statt? Rein quantitativ sollte sich der Umstand der Partikelresorption, -aggregation oder -destruktion bei einheitlicher Probenverdünnung vermindern auf die Werte für die Partikelhäufigkeiten auswirken. Dies lässt sich jedoch mit dem Verfahren des Particle Tracking, aufgrund der messtechnisch bedingten Schwankungen, nicht exakt nachweisen. Zudem ist zu erwarten, dass es, infolge der perfusionsbegleitenden Verdünnung der Dispersionen, von den Proben nach 0 Minuten zu den Proben nach 30 Minuten durch Vermischen mit dem vorhandenen, kapselfreien Kreislaufvolumen zu einem starken Einbruch in den Häufigkeitsmaxima kommt. Hingegen sollte sich der Tatbestand eines größenselektiven Partikelverlustes in Unterschieden in den Größenverteilungen bzw. Verteilungsbreiten der zurückgewonnenen Dispersionen niederschlagen und somit direkt messbar sein. Außerdem können die Messungen der Referenzproben genutzt werden, um die Reproduzierbarkeit der Synthese über die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und damit die Befürwortung der gewählten Technik zur Kapselproduktion zu unterstreichen.

Die Festlegung der Probenbezeichnung verläuft auch hier analog zur Kennzeichnung vorausgegangener Particle Tracking-Messungen. Insgesamt werden 19 Proben aus vier Probenreihen untersucht:

Proben-/Messreihe LPI

1. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPI_0 min
2. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPI_30 min
3. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPI_60 min
4. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPI_90 min
5. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPI_120 min

Proben-/Messreihe LPII

1. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPII_0 min
2. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPII_30 min
3. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPII_60 min
4. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPII_90 min
5. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPII_120 min

Proben-/Messreihe LPIII

1. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIII_0 min
2. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIII_30 min
3. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIII_60 min
4. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIII_90 min
5. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIII_120 min

Proben-/Messreihe LPIV

1. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIV_0 min
2. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIV_30 min
3. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIV_60 min
4. Probe Messung $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ LPIV_75 min

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in Form einer Gegenüberstellung der einzelnen Messungen einer Probenreihe im Vergleich mit der jeweiligen Referenzprobe nach 0 Minuten Perfusion.

Leberperfusion 1. Durchlauf (LPI)

Die Größenverteilungen, die sich aus den Messungen der Proben der Probenreihe LPI ergeben, sind in Abbildung 4.66 gegeneinander aufgetragen. Die Ergebnisse der entsprechenden Gaußanalysen sind in Tabelle 4.11 zu finden.

Tabelle 4.11: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Probenreihe LPI

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPI_0 min	180 ± 3	111 ± 6
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPI_30 min	143 ± 2	90 ± 5
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPI_60 min	170 ± 2	90 ± 5
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPI_90 min	196 ± 6	170 ± 13
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPI_120 min	230 ± 8	176 ± 19

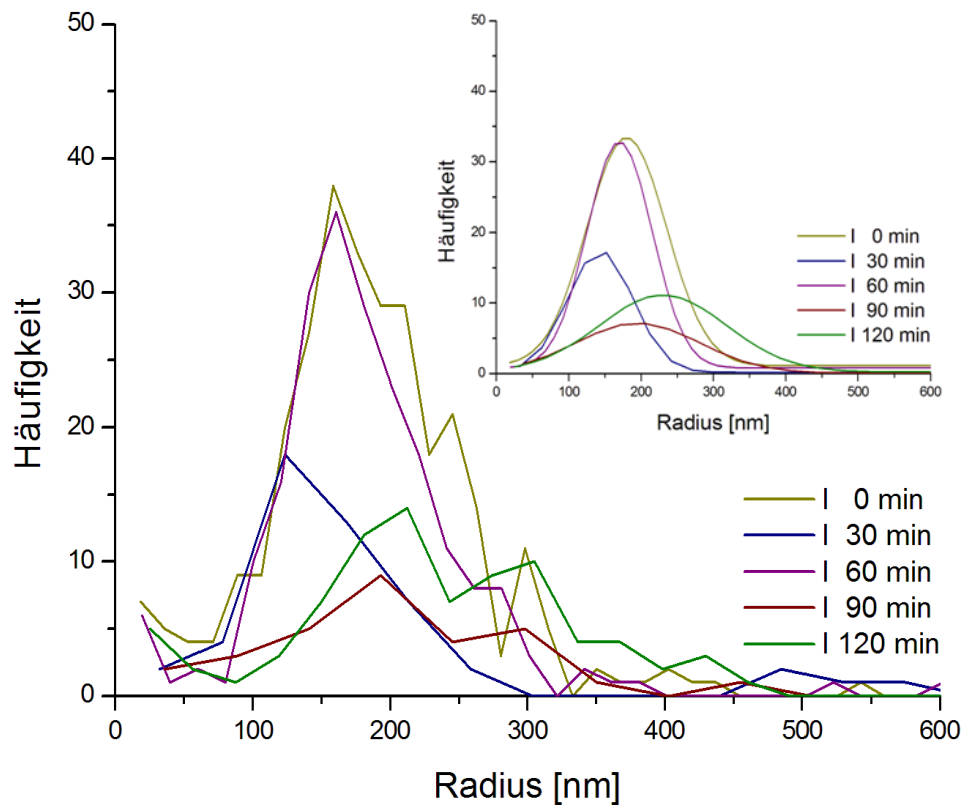


Abbildung 4.66: Größenverteilungen der Probenreihe LPI. Oben rechts: Normalverteilungen der Probenreihe LPI.

Wie in Abbildung 4.66 ersichtlich deckt die Verteilung der Ausgangsprobe nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPI 0 min Partikelradien in einem Größenbereich zwischen ca. 80 nm und 280 nm ab. Nahezu konform zeigt sich die Partikelgrößenverteilung der Probe nach 60 Minuten Perfusionsdauer. Die Partikelradien der übrigen Proben liegen zwischen ungefähr 80 nm und 200 nm für nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPI 30 min und ungefähr 140 nm und 350 nm für nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPI 90 min und 120 min mit den erwarteten geringeren Häufigkeitswerten als die Referenzprobe. Die Messungen deuten tendenziell eine Verlagerung der

Partikelkonzentration in Richtung größerer Teilchen (oberhalb 130 nm bis 140 nm im Radius) mit zunehmender Perfusionsdauer an.

Leberperfusion 2. Durchlauf (LP II)

Ein Vergleich der Größenverteilungen der Messungen der Probenreihe LP II kann mit Hilfe von Abbildung 4.67 angestellt werden. Die Ergebnisse der Gaußanalyse können der Tabelle 4.12 entnommen werden.

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Probenreihe LP II

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$nk(O^{\text{Opti1}}_{a_{33}})_{\text{PBCA/PFD}} \text{ LP II_0 min}$	239 ± 3	112 ± 6
$nk(O^{\text{Opti1}}_{a_{33}})_{\text{PBCA/PFD}} \text{ LP II_30 min}$	205 ± 3	102 ± 7
$nk(O^{\text{Opti1}}_{a_{33}})_{\text{PBCA/PFD}} \text{ LP II_60 min}$	197 ± 6	122 ± 12
$nk(O^{\text{Opti1}}_{a_{33}})_{\text{PBCA/PFD}} \text{ LP II_90 min}$	194 ± 2	86 ± 3
$nk(O^{\text{Opti1}}_{a_{33}})_{\text{PBCA/PFD}} \text{ LP II_120 min}$	119 ± 2	74 ± 5

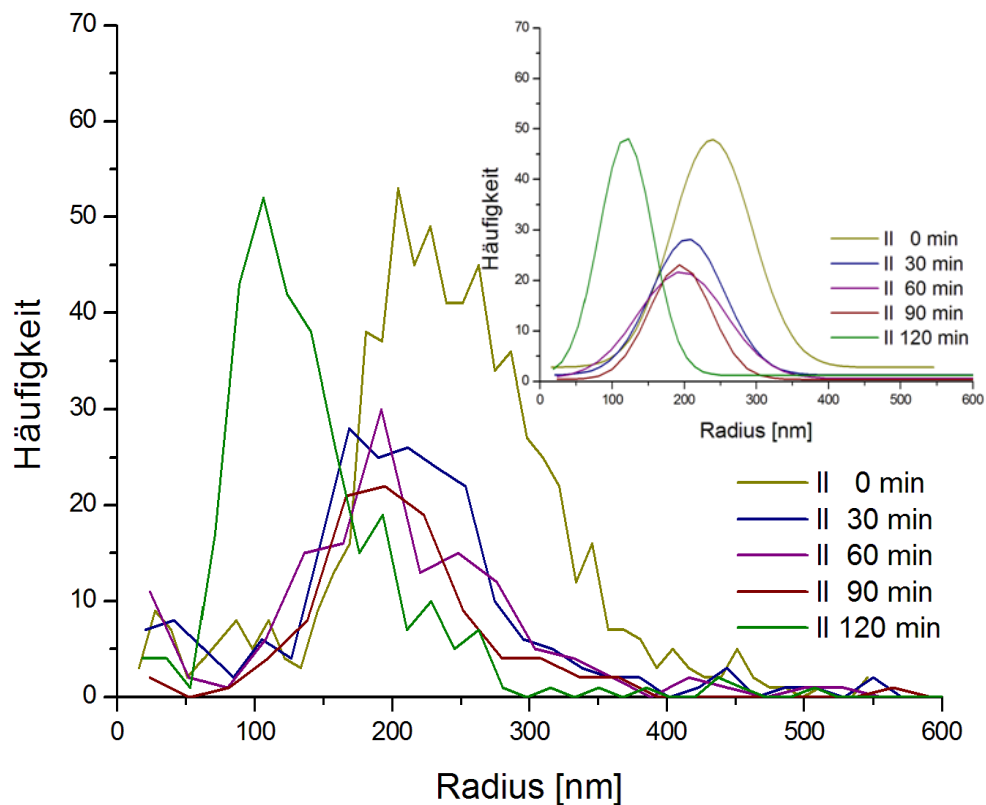


Abbildung 4.67: Größenverteilungen der Probenreihe LP II. Oben rechts: Normalverteilungen der Probenreihe LP II.

Probenreihe LP II zeigt eine gegenläufige Beobachtung. Während die Referenzprobe Kapseln mit einer Hauptverteilungsbreite zwischen rund 130 nm und 350 nm im Radius aufweist, liegen die Partikelgrößen der Proben $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}}$ LP II 30 min bis einschließlich $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}}$ LP II 90 min im Bereich zwischen 110 nm und 300 nm. Die Verteilung der Probe, die 120 Minuten perfundiert wurde, ist im Vergleich zur ursprünglichen noch stärker linksverschoben mit einem hohen Anteil an Partikelradien zwischen ungefähr 50 nm und knapp 200 nm. Als Konsequenz folgt daraus ein Verlust größerer Partikel bei ansteigender Perfusionsdauer. Im Vergleich zur Leberperfusion I ein Ergebnis mit entgegengesetzter Aussage.

Leberperfusion 3. Durchlauf (LP III)

Die Messergebnisse dieser Probenreihe werden in Abbildung 4.68 dargestellt. Die Ergebnisse der Gaußanalysen werden in Tabelle 4.13 wiedergegeben.

Tabelle 4.13: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Probenreihe LPIII

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPIII_0 min	84 ± 4	32 ± 8
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPIII_30 min	215 ± 3	66 ± 7
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPIII_60 min	192 ± 1	96 ± 3
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPIII_90 min	202 ± 1	64 ± 2
nk(O ^{Opti1} a ₃₃) _{PBCA/PFD} LPIII_120 min	208 ± 4	63 ± 7

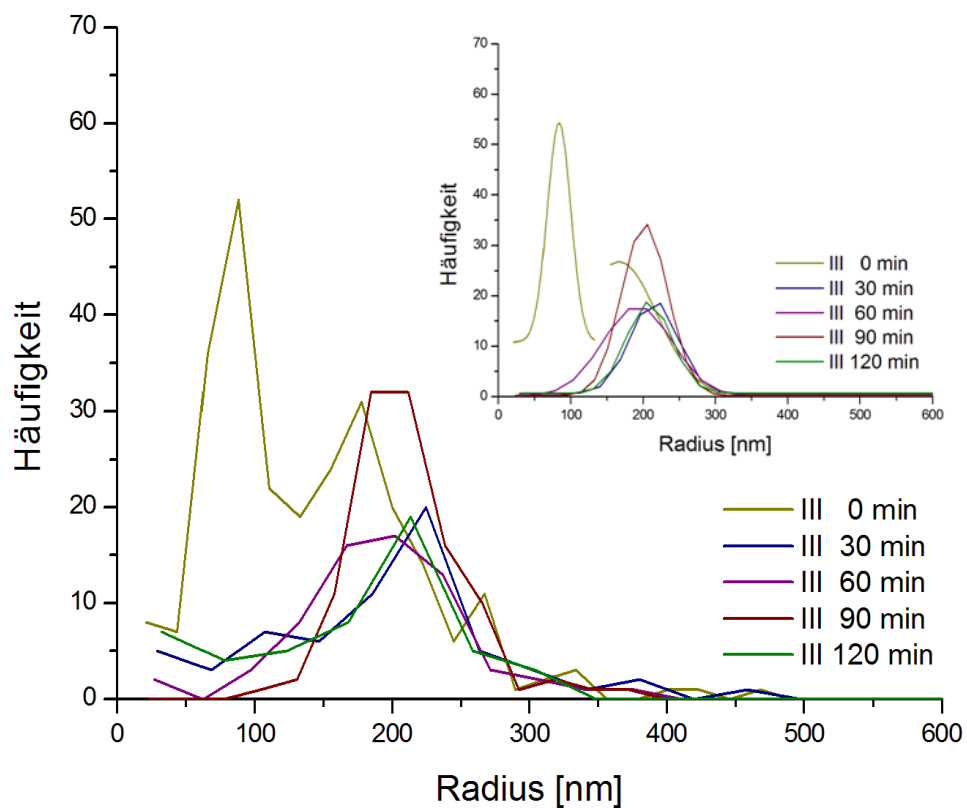


Abbildung 4.68: Größenverteilungen der Probenreihe LPIII. Oben rechts: Normalverteilungen der Probenreihe LPIII.

Abbildung 4.68 zeigt ein relativ eindeutiges Gesamtergebnis. Aus dem Perfusionsdurchlauf resultiert eine Verlagerung der Partikelgrößenverteilungen in Richtung größerer Radien von ursprünglich ungefähr 50 nm bis knapp 250 nm auf nunmehr rund 150 nm bis 250 nm. Hierbei weist die Probe nk(O^{Opti1}a₃₃)_{PBCA/PFD} LPIII 90 min mit einem Häufigkeitsmaximum von etwas mehr als 30 den höchsten Anteil an Partikeln dieser Größe auf. Rückschließend bewirkt die Perfusion in diesem Durchgang eine Verminderung der Konzentration kleinerer Nanokapseln mit Radien unterhalb von ca. 150 nm, wobei die Selektion bereits nach 30 Minuten abge-

geschlossen zu sein scheint. Danach treten keine gravierenden Veränderungen der Messergebnisse mehr auf.

Leberperfusion 4. Durchlauf (LPIV)

Bei dieser Probenreihe konnte die Perfusion aus technischen Gründen nicht für eine Zeitspanne von 120 Minuten aufrechterhalten werden, so dass die letzte Probe nach nur 75 Minuten erhalten wurde. Das bedeutet, es fehlen die Proben $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA/PFD}}$ LPIV 90 min und 120 min. Die aus den Messungen resultierenden Größenverteilungen sind in Abbildung 4.69 dargestellt. In Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse der entsprechenden Gaußanalysen eingetragen.

Tabelle 4.14: Ergebnisse der Partikelradien-Gaußanalysen für die Proben der Probenreihe LPIV

Messung	Mittlerer Radius [nm]	Halbwertsbreite [nm]
$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA/PFD}}$ LPIV_0 min	$85 \pm 1/187 \pm 5$	$44 \pm 8/178 \pm 11$
$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA/PFD}}$ LPIV_30 min	197 ± 7	182 ± 16
$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA/PFD}}$ LPIV_60 min	199 ± 13	229 ± 32
$\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PBCA/PFD}}$ LPIV_75 min	236 ± 12	223 ± 27

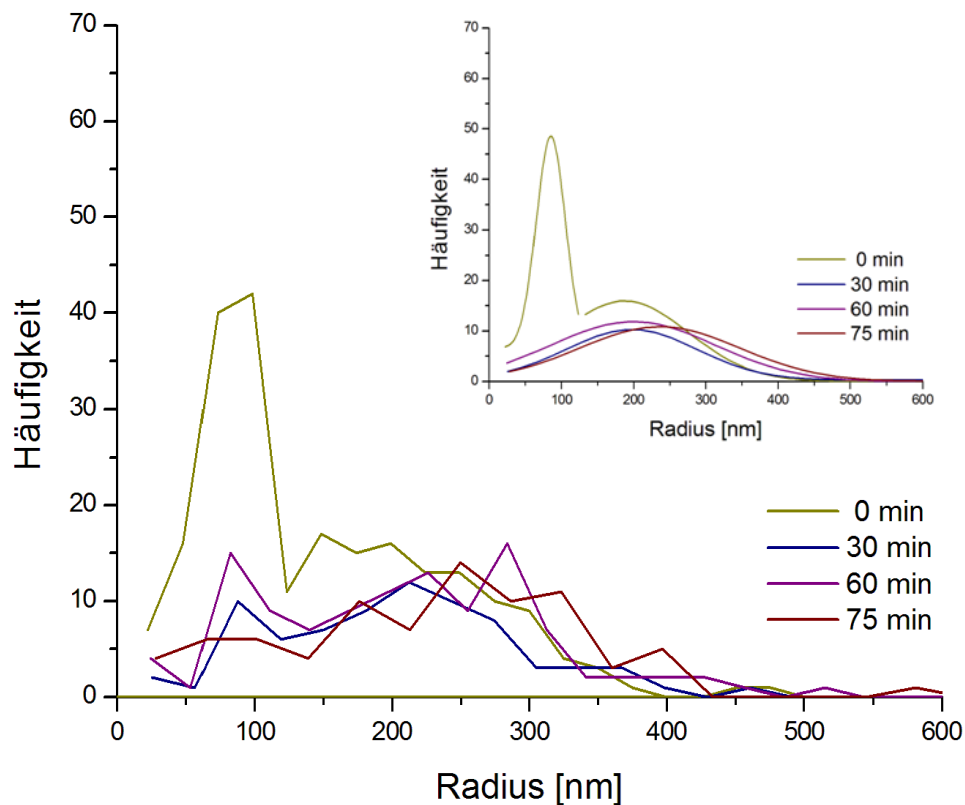


Abbildung 4.69: Größenverteilungen der Probenreihe LPIV. Oben rechts: Normalverteilungen der Probenreihe LPIV.

Unter Berücksichtigung einer unvollständigen Probenreihe ergibt sich als Resultat dieses Perfusionsexperiments prinzipiell ein ähnliches Bild wie zuvor. Die Größenverteilung der Referenzprobe erstreckt sich über einen Radienbereich von ca. 50 *nm* bis 300 *nm* mit einem Hauptanteil im unteren Größenbereich bis ungefähr 130 *nm*. Die perfundierten Proben zeigen untereinander vergleichbare Verteilungen auf. Mit ähnlich niedrigen Häufigkeiten wie die ursprüngliche Größenverteilung decken sie im Wesentlichen den Bereich zwischen knapp 100 *nm* und 360 *nm* ab. Der Anteil kleinerer Partikel hat sich im direkten Vergleich zur Referenzprobe stark verringert. Wie bei LPIII ist auch in diesem Fall zu vermuten, dass die Selektion nach 30 Minuten Perfusion abgeschlossen ist.

In ihrer Gesamtheit geben die Messungen Grund zu der Annahme, dass es im Verlauf der Perfusionsversuche tatsächlich zu selektiven Modifikationen der Partikelgrößenverteilungen kommt. Mit Ausnahme der Ergebnisse des zweiten Leberperfusionsdurchlaufs (LPII) weist dabei die Mehrheit der Experimente einen signifikanten Verlust an kleineren Kapseln mit einer Größe von bis zu 300 *nm* im Durchmesser bei fortschreitender Perfusion auf. Dabei schrumpft der Anteil kleiner Partikel bereits nach einer Perfusionsdauer von 30 Minuten auf ein Minimum, was besonders deutlich bei den Durchläufen LPIII und LPIV zu erkennen ist.

Ob die Teilchen hierbei aggregieren, vom System resorbiert oder gar zerstört werden kann auf alleiniger Grundlage dieser Messungen jedoch nicht geklärt werden.

Vergleicht man die Größenverteilungen der Referenzproben mit den in Kapitel 4.3.1.1 erhaltenen Resultaten der Syntheseoptimierung 1 (Messungen $nk(O^{Opt1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$ PT1 und 2) zeigen sich im Mittel gute Übereinstimmungen in den durchschnittlich erzeugten Partikelgrößen. Hierzu sind die entsprechenden Verteilungen in Abbildung 4.70 gegeneinander aufgetragen.

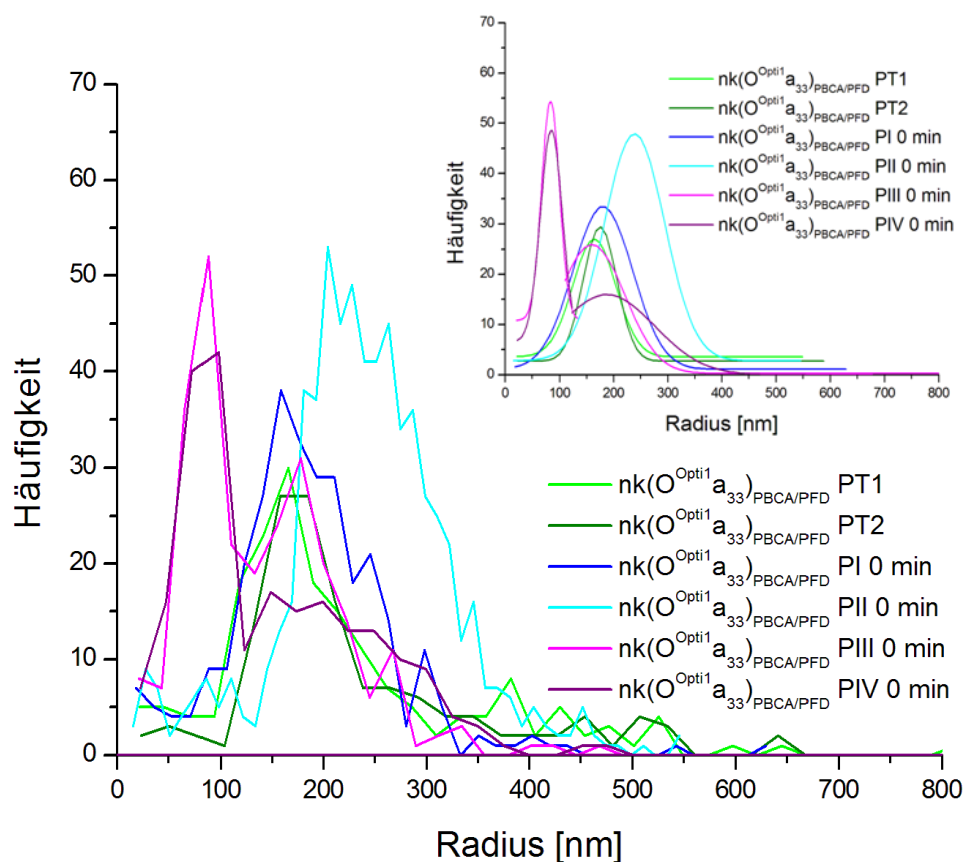


Abbildung 4.70: Vergleich der Größenverteilungen der 0 Minuten perfundierten Proben aller Probenreihen mit den Größenverteilungen der optimierten Proben $nk(O^{Opt1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$ der Standardsynthese. Oben rechts: korrespondierende Normalverteilungen.

Die Probe LPII weicht durch eine hohe Konzentration an größeren Partikeln deutlich von den Größenverteilungen der Optimierungsmessungen ab. Die Verteilungen der Referenzproben LPIII und LPIV zeigen im Gegensatz dazu in Gestalt einer bimodalen Größenaufspaltung Abweichungen in Richtung kleinerer Partikel und liegen in diesem Abschnitt außerhalb des gemeinsamen Größenbereichs. Darüber hinaus sind die gemessenen Kapselgrößen jedoch gut mit den Messungen der Optimierung zu vereinbaren, so dass die Synthese mit durch-

schnittlichen Partikelgrößen zwischen rund 200 nm und 600 nm im Durchmesser als reproduzierbar eingestuft werden kann.

4.5.3 Ergebnisse und Diskussion der NMR-Untersuchungen

Auch mittels der NMR können Informationen über eine Veränderung der Partikelkonzentration gewonnen werden. Dafür wird der Anteil an verbliebenem Perfluordecalin, also der Fluorgehalt der Dispersionen nach der Perfusion bestimmt. Hierzu werden die Proben vermessen, die auch für die Particle Tracking-Untersuchungen herangezogen wurden. Eine genauere Ausführung der Messungen ist in Kapitel 3.5.4.2 beschrieben. Bei der Regelung der Nomenklatur der NMR-Messungen wird gemäß den vorausgegangenen Particle Tracking-Untersuchungen verfahren (vgl. Kapitel 4.5.2). Eine Zusammenfassung der ermittelten Fluorgehalte aller Proben kann der nachfolgenden Tabelle 4.15 entnommen werden, grafisch wird dies in Abbildung 4.71 umgesetzt.

Tabelle 4.15: Gemessene Fluorgehalte aller Proben des Leberperfusionsexperiments mittels NMR. Als Referenz werden die Proben nach 0 Minuten Perfusion auf 100% gesetzt.

Probe	0 min	30 min	60 min	75 min	90 min
nk(O ^{Opti1} a ₃₃)PBCA/PFD LPI	100%	31,92%	28,91%		31,17%
nk(O ^{Opti1} a ₃₃)PBCA/PFD LPII	100%	43,47%	38,73%		35,61%
nk(O ^{Opti1} a ₃₃)PBCA/PFD LPIII	100%	34,43%	34,11%		28,45%
nk(O ^{Opti1} a ₃₃)PBCA/PFD LPIV	100%	34,33%	24,35%	24,82%	

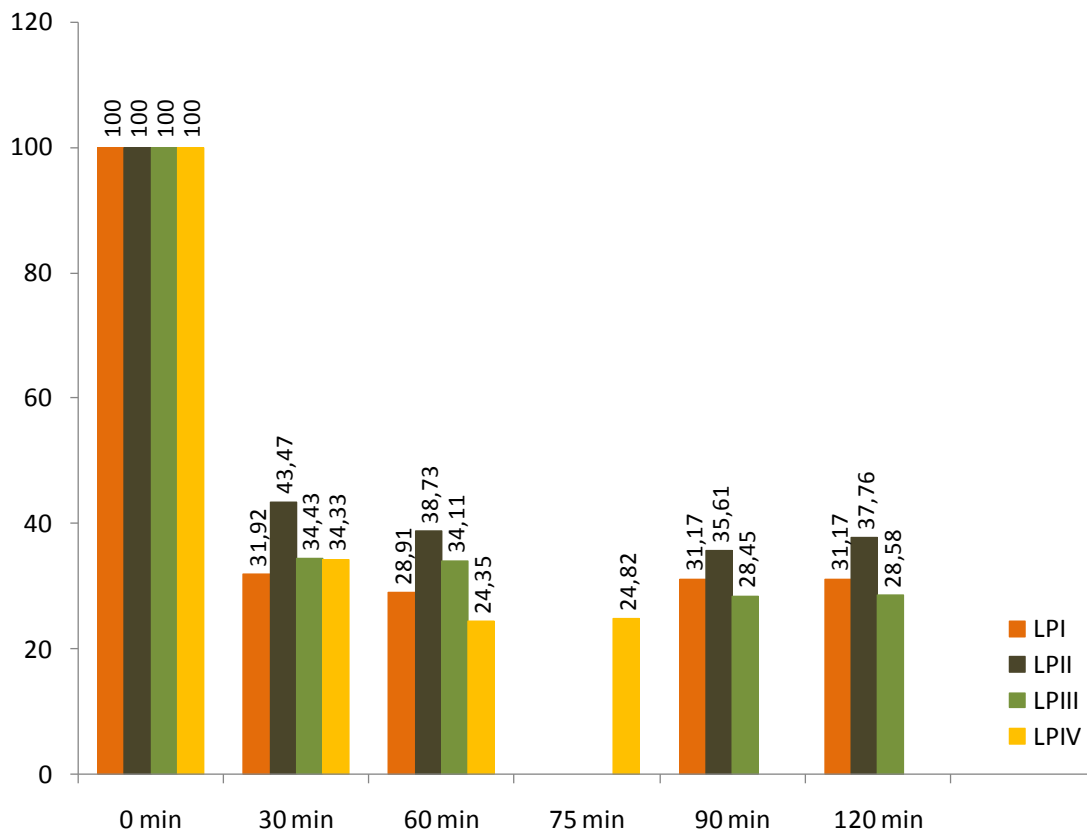


Abbildung 4.71: Graphische Übersicht des Fluorgehalts aller perfundierten Proben mittels NMR-Spektroskopie. Zur Referenzierung wird der Gehalt der Proben nach 0 Minuten Perfusion auf 100% gesetzt.

Insgesamt ist eine sprunghafte Abnahme des Fluorgehalts zu beobachten, sobald die Dispersionen der Perfusion ausgesetzt sind. So sinkt der Anteil an PFC nach 30 Minuten um bis zu knapp 65 bis 70%. Rein rechnerisch wäre ein Abfall auf ungefähr 37,5% zu erwarten. Dieser Wert ergibt sich durch die, aufgrund des Kreislaufvolumens, verursachte Verdünnung der Probe 0 min aus dem Reservoir und ist, unter Berücksichtigung von Unsicherheiten bezüglich der Verdünnung bzw. des exakten Perfusionsvolumens sowie der Messgenauigkeit des Spektroskops, mit den ermittelten Konzentrationen in Einklang zu bringen. Im weiteren Verlauf der Perfusionen weisen die Proben des ersten Durchlaufs, LPI, eine relativ konstante Fluorkonzentration über den beanschlagten Zeitraum auf. Im zweiten Experiment, LPII, verringert sich der Gehalt an Fluor nach 90 Minuten im Verhältnis zu den zuvor gemessenen Proben geringfügig. Ähnlich verhalten sich die Messergebnisse des dritten Durchlaufs, LPIII. Auch hier bleibt der Fluorgehalt nach der Verdünnung zunächst relativ konstant. Die gemessenen Werte der Proben $nk(O^{Opti1}a_{33})_{PBCA/PFD}$ 90 min und 120 min deuten jedoch auf einen Verlust an Fluor hin. Beim vierten Durchlauf, LPIV, ist diese Tendenz etwas auffälliger. Hier reduziert sich der Fluorgehalt bereits nach 60 Minuten um nahezu 10% im Vergleich zum Gehalt nach 30 Minuten. Allerdings musste dieser Durchlauf nach nur 75 Minuten beendet werden, so dass eine weitere Abnahme der Fluorkonzentration rein spekulativ ist. Schenkt

man dieser, wenngleich äußerst geringen Abnahme an Fluor Bedeutung und geht man davon aus, dass ein vollständiger Einschluss von Perfluordecalin in Polymerkapseln erfolgte, lässt sich auch aus den vorliegenden Messergebnissen in Vereinbarung mit dem Resultat der PT-Untersuchungen ableiten, dass es während des Perfusionsexperiments zu einer Dezimierung fluorhaltiger Partikel im Perfusionsmedium kommen muss. Der Grund der Einbuße kann aber auch mittels der Kernspinresonanzspektroskopie nicht exakt lokalisiert werden. Würde es sich „bloß“ um eine Verklumpung oder Zerstörung der kleineren Kapseln handeln, sollte der Fluorgehalt konstant bleiben – vorausgesetzt, dass die Agglomerate oder Partikelfragmente weiterhin ungehindert mit dem Medium durch die Perfusionsanlage fließen. Daher besteht der dringende Verdacht, dass die Kapseln auf irgendeine Weise vom System, sprich der Leber und/oder anderen Kreislaufbestandteilen, herausgefiltert bzw. zurückgehalten oder aufgenommen werden. Die Ergebnisse der physiologischen Messungen verweisen primär jedoch nicht zwingend auf eine Resorption der Kapseln durch die Leberzellen. Um dies endgültig zu klären, sind weitere Versuche und Nachuntersuchungen nötig, die den aktuellen Kenntnisstand dieser Arbeit jedoch überschreiten.

5. Zusammenfassung

Diese Forschungsarbeit ist Teil eines Verbundprojektes durch Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot. Das gemeinsame Bestreben der Kooperation ist die Entwicklung eines potentiellen Sauerstoffträgers für künstlichen Blutersatz in Form von perfluorcarbongefüllten Polymernanokapseln in wässriger Dispersion. Im Mittelpunkt der ersten Projektphase stehen die Ausarbeitung einer effizienten Synthesestrategie zur Präparation der Nanokapseln und eine Untersuchung geeigneter Charakterisierungs- bzw. Nachweismethoden.

Neben der Entwicklung von Ersatzstoffen auf Basis modifizierten Hämoglobins stellt die physiologische Analyse von Perfluorcarbonen (PFCs) als Material zur Erzeugung abiotischer Sauerstoffträger inzwischen einen zweiten, bedeutenden Forschungszweig auf diesem Gebiet dar. In ihrer Funktion als synthetischer Ersatz zielt ihre Anwendung in erster Linie auf die Unterstützung und Sicherstellung der Sauerstoffversorgung und des Blutvolumens bei akutem Blutverlust ab.

Perfluorcarbone sind vollständig oder auch partiell fluorierte Kohlenwasserstoffe mit einer hohen Aufnahme- und Abgabekapazität für respiratorische Gase wie Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid. Zudem sind sie chemisch und biologisch inert und ihr Vorrat ist quasi unbegrenzt. Ihre ausgeprägte Hydro- sowie Lipophobie veranlasst die Emulgierung von Perfluorcarbonen in einem wässrigen Medium, um ihre Aufnahme in den Blutkreislauf zu bewerkstelligen. Als nachteilig erweist sich jedoch die oftmals geringe Stabilität solcher Emulsionen und die damit verbundenen physiologischen Nebenwirkungen oder Begleiterscheinungen. Als Lösung bietet sich die Einkapselung der Emulsionstropfen innerhalb einer festen Polymerhülle an. Auf diesem Wege können sowohl eine Festigung der dispersen Struktur als auch eine Maskierung der Perfluorcarbontropfen erreicht werden.

Zur Einkapselung von Perfluorcarbonen werden in dieser Arbeit im Wesentlichen zwei Präparationsansätze untersucht. Dabei handelt es sich zum Einen um eine Nanopartikelsynthese auf Grundlage des sogenannten Ouzo-Effekts, auch bekannt unter dem Begriff der spontanen Emulgierung, zum Anderen wird ein Einkapselungsverfahren getestet, das sich stärker an den Prozess der technischen Emulgierung und anschließender Lösemittelverdampfung anlehnt. Als Perfluorcarbon wird Perfluordecalin (PFD) verwendet. Als Kapsel-

wandmaterial stehen die beiden Polymere Polybutylcyanacrylat (PBCA) und Polylactid-co-Glycolid (Polylactide-co-glycolic acid, PLGA) zur Verfügung.

Mit dem Verfahren der Emulgierung und Lösemittelverdampfung wird unter Zuhilfenahme eines Pump-Injektions-Systems und eines Rotor-Stator-Rührers eine Emulsion von Perfluordecalin und Methylenchlorid in wässriger Natriumcholatlösung erzeugt. Die organische Phase enthält zudem das kapselwandbildene Polymer PLGA. Im Anschluss daran wird das chlorierte Lösemittel unter vorsichtigem Rühren verdampft. Die auf diesem Wege produzierten Dispersionen erweisen sich als äußerst instabil, da sich unmittelbar nach der Synthese zwei makroskopisch getrennte Phasen ausbilden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass es infolge der hohen Dichte des Perfluorcarbons zu Sedimentationsbewegungen großer Partikel kommt.

Mit Hilfe des Ouzo-Effekts können hingegen stabile Partikel- bzw. Kapseldispersionen ohne die Einwirkung extremer mechanischer Kraftanstregungen bzw. Energieeinträge hergestellt werden. Hierzu wird zunächst eine Lösung des Perfluorcarbons in einem Gemisch verschiedener Lösemittel, dem Monomer BCA oder dem Polymer PLGA sowie dem Blockcopolymer Synperonic als Stabilisator vorbereitet und mit einem Überschuss wässriger Synperonic-Lösung versetzt. Die Partikelentwicklung beruht dabei auf dem Prozess der Nukleation und Keimbildung mit nachfolgendem Wachstum und Ausbildung der Kapselwand. Die Erzeugung stabiler Dispersionen ist sowohl unter Verwendung von Butylcyanacrylat als auch unter Verwendung von Polylactid-co-Glycolid möglich.

Im Zuge erster physiologischer Tests wird die Konzentration aber verstärkt auf die Präparation perfluordecalingefüllter Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln gerichtet. Dafür wird die Synthesestrategie, basierend auf dem Ouzo-Effekt, in einem zweiten Schritt hinsichtlich des Monomer- und Tensidgehalts optimiert.

Zur Charakterisierung der Dispersionen stehen drei Methoden zur Verfügung. Mittels des Particle Tracking (PT) ist es möglich, die durchschnittliche Partikelgröße zu ermitteln bzw. eine Verteilungsfunktion der Partikelgrößen zu erhalten. Dazu wird durch videomikroskopische Technik die Brown'sche Bewegung der Teilchen verfolgt, um über die Stokes-Einstein-Beziehung den Partikelradius individuell bestimmen zu können. Dieser liegt im Fall der optimierten PBCA-Nanokapseln im reproduzierbaren Bereich von ungefähr 100 bis 300 nm.

Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) gelingt es, die morphologischen Eigenschaften sowie die Elastizität der Nanokapseln über kraftspektroskopische

sche Experimente nachzuweisen. Dazu werden die Partikel durch stetiges Herabsenken der AFM-Spitze eingedrückt. Handelt es sich um Partikel mit Kern-Schale-Struktur, so verursacht der Einkerbungsversuch nach dem Entfernen der Spitze die Ausbildung eines charakteristischen Faltungsmusters auf der Polymeroberfläche. Zusätzlich kann die erforderliche Kraft, die aufgewendet werden muss, um die Spitze hinabzubewegen, gegen die Spitzenposition aufgetragen werden. Die Interpretation der einzelnen Abschnitte des resultierenden Kraftkurvenverlaufs lässt sich nahezu konsistent mit den Gegebenheiten des Kapseltypus vereinbaren. Für Polymer-Nanokapseln aus Polybutylcyanoacrylat zeigt sich darüber hinaus ein gewisses Maß an Regenerationsvermögen. Die AFM-Aufnahmen deuten darauf hin, dass die Deformation der Kapselwand nach dem Herauffahren der Spitze teilweise reversibel verläuft. Dieses Verhalten kann für Nanokapseln aus Polylactid-co-Glycolid nicht beobachtet werden.

Die Gasdurchlässigkeit der Polymerwand sowie die Gasaufnahmekapazität perfluordecalin-gefüllter PBCA-Nanokapseln werden mittels kernresonanzspektroskopischer Messmethoden (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) untersucht. Hierdurch kann festgestellt werden, dass zwischen der chemischen Verschiebung des ^{19}F -Signals von Perfluordecalin in reiner Form oder im eingekapselten Zustand und dem Sauerstoffgehalt ein linearer Zusammenhang besteht. In gleicher Weise korreliert die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 mit der Sauerstoffkonzentration. In sogenannten Gas-Kinetik-Experimenten werden die Kapseldispersionen während der Messung der paramagnetischen Verschiebung des Fluorsignals alternierend mit Sauerstoff und Stickstoff begast. Für reines Perfluordecalin lässt sich anhand der zuvor erhaltenden Daten der Korrelationsfunktionen der Grad der Sauerstoffsättigung in Abhängigkeit vom Begasungszeitpunkt direkt ablesen. Analoge Übertragungen sind auch für die Kapseldispersionen angedacht. Bisher kann jedoch lediglich der Wechsel in der Gasaufnahme und -abgabe beobachtet werden.

Im Rahmen erster physiologischer Beständigkeits- und Tauglichkeitstests werden von den Kooperationspartnern des Universitätsklinikums *ex vivo-/in vitro*-Untersuchungen mit den optimierten PFD-PBCA-Kapseln durchgeführt. Hierfür werden Rattenlebern innerhalb eines extrakorporalen Zirkulationssystems mit den Kapseldispersionen perfundiert und physiologische Parameter im Vergleich mit Messungen an perfundierter Krebs-Henseleit-Pufferlösung kontrolliert. Hierbei lassen sich keine gravierenden Abweichungen und in einigen Fällen sogar ein verbessertes Resultat gegenüber den Kontrollwerten feststellen. Des Weiteren werden temporal unterschiedlich lang perfundierte Proben mittels Particle Tracking und NMR analysiert. Die Messungen sollen Aufschluss darüber geben, ob sich während des Zirkulationsvorgangs durch die Leber Veränderungen hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung, ihrer Konzentration und der Stabilität der Kapseln ergeben haben. Die Ergebnisse beider Analy-

semethoden legen den Verdacht nahe, dass es im Verlauf der Perfusion zu Einbußen in der Perfluordecalin- bzw. Partikelkonzentration kommt. Per PT ist ein Verlust kleinerer Partikel zu verzeichnen, aus den NMR-Messungen geht eine Abnahme der Fluorkonzentration hervor. Hierbei ist jedoch zu vermuten, dass es sich lediglich um ein technisches Problem handelt. Eine Filterung der Kapseln durch die Leber ist zunächst auszuschließen, da die Analyse der physiologischen Parameter keinen dringenden Anlass zur Sorge gibt. Geht man davon aus, dass die Partikel während der Perfusion nicht zerstört werden, besteht alternativ die Möglichkeit, dass die Kapseln von den übrigen Kreislaufkomponenten zurückgehalten werden könnten, was es noch zu überprüfen gilt.

Auf der Grundlage dieser ersten Untersuchungsergebnisse erweisen sich die hier hergestellten Polymer-Nanokapseln als vielversprechender Kandidat für die Rolle eines zukünftigen Sauerstofftransporteurs auf dem Markt synthetischer Blutersatzstoffe und ermutigen zur Fortsetzung dieser Arbeit und weiterer Projekte auf diesem Forschungsgebiet.

6. Anhang

Tabellen

Tabelle 6.1 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(O)_{PBCA/PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$nk(O)_{PBCA/PFD}1$ PT	23,3	4,8	30	240 x 240
$nk(O)_{PBCA/PFD}2$ PT	22,9	8,0	30	240 x 240
$nk(O)_{PBCA/PFD}3$ PT	23,8	1,0	30	240 x 240

Tabelle 6.2 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(O)_{PLGA/PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$nk(O)_{PLGA/PFD}1$ PT	23,4	7,0	30	240 x 240
$nk(O)_{PLGA/PFD}2$ PT	26,0	2,6	30	240 x 240
$nk(O)_{PLGA/PFD}3$ PT	24,3	1,8	30	240 x 240

Tabelle 6.3 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(RS)_{PBCA/Miglyol}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$nk(RS)_{PBCA/Miglyol}1$ PT	22,2	3,0	30	240 x 240
$nk(RS)_{PBCA/Miglyol}2$ PT	22,9	3,6	30	240 x 240
$nk(RS)_{PBCA/Miglyol}3$ PT	24,6	5,1	30	240 x 240

Tabelle 6.4 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(LV)_{PLGA/PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$nk(LV)_{PLGA/PFD}1$ PT	24,4	3,5	30	240 x 240
$nk(LV)_{PLGA/PFD}2$ PT	25,7	2,2	30	240 x 240
$nk(LV)_{PLGA/PFD}3$ PT	24,5	2,5	30	240 x 240

Tabelle 6.5 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(O^{Opti1}_{a_{ij}})_{PBCA/PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
a11 PT1	31,0	2,8	30	240 x 240
a11 PT2	24,1	2,5	30	240 x 240
a12 PT1	24,9	2,9	30	240 x 240
a12 PT2	22,2	2,8	30	240 x 240
a13 PT1	26,2	2,5	30	240 x 240
a13 PT2	25,4	14,1	30	240 x 240
a21 PT1	24,7	4,1	30	240 x 240
a21 PT2	25,0	3,0	30	240 x 240
a22 PT1	23,3	1,6	30	240 x 240
a22 PT2	23,7	3,1	30	240 x 240
a23 PT1	24,2	2,5	30	240 x 240
a23 PT2	24,8	5,6	30	240 x 240
a31 PT1	23,4	6,3	30	240 x 240
a31 PT2	25,3	5,9	30	240 x 240
a32 PT1	21,9	6,0	30	240 x 240
a33 PT1	24,4	3,5	30	240 x 240
a33 PT2	25,9	2,9	30	240 x 240

Tabelle 6.6 Angaben zur PT-Probenmessung der Emulsion $emu(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$emu(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PFD}$	23,0	4,0	30	240 x 240

Tabelle 6.7 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanosphärendispersionen $ns(O^{Opti1}_{a33})_{PBCA}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$ns(O^{Opti1}_{a33})_{PBCA/PFD}$	23,5	4,4	30	240 x 240

Tabelle 6.8 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(O^{Opti2}_{1zu9})_{PBCA/PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$nk(O^{Opti2}_{1zu9})_{PBCA/PFD}$	23,6	1,5	30	240 x 240
$nk(O^{Opti2}_{1zu20})_{PBCA/PFD}$	22,5	4,1	30	240 x 240

Tabelle 6.9 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(O^{Opti3}_{EtOH})_{PBCA/PFD}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
$nk(O^{Opti3}_{EtOH})_{PBCA/PFD} 1 PT$	23,3	4,8	30	240 x 240
$nk(O^{Opti3}_{EtOH})_{PBCA/PFD} 2 PT$	23,6	4,6	30	240 x 240

Tabelle 6.10 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $nk(O^{Opti1}_{a33})_{PBCA/PFD} LPI$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
LPI_0min	24,1	2,3	30	240 x 240
LPI_30min	26,0	1,3	30	240 x 240
LPI_60min	24,7	2,1	30	240 x 240
LPI_90min	26,2	4,9	30	240 x 240
LPI_120min	23,9	6,0	30	240 x 240

Tabelle 6.11 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}}\text{LP}_{\text{II}}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
LP _{II} _0min	25,5	4,5	30	240 x 240
LP _{II} _30min	25,6	6,0	30	240 x 240
LP _{II} _60min	25,9	3,0	30	240 x 240
LP _{II} _90min	26,1	1,6	30	240 x 240
LP _{II} _120min	24,8	1,2	30	240 x 240

Tabelle 6.12 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}}\text{LP}_{\text{III}}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
LP _{III} _0min	24,4	2,0	30	240 x 240
LP _{III} _30min	25,3	5,0	30	240 x 240
LP _{III} _60min	24,7	2,0	30	240 x 240
LP _{III} _90min	25,6	2,5	30	240 x 240
LP _{III} _120min	26,8	3,6	30	240 x 240

Tabelle 6.13 Angaben zur PT-Probenmessung der Nanokapseldispersionen $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a33}})_{\text{PBCA/PFD}}\text{LP}_{\text{IV}}$

Probenbezeichnung	Messtemperatur [°C]	Schichtdicke [μm]	Sequenzen	Bildausschnittgröße [pixel]
LP _{IV} _0min	25,5	2,0	30	240 x 240
LP _{IV} _30min	24,2	2,1	30	240 x 240
LP _{IV} _60min	25,2	2,8	30	240 x 240
LP _{IV} _75min	26,3	2,6	30	240 x 240

Tabelle 6.14: Technische Daten der verwendeten Cantilever

Cantilever-Parameter	Wert	Schwankungsbereich
Dicke	$4\ \mu m$	$3,5 - 4,5\ \mu m$
Breite	$30\ \mu m$	$25 - 35\ \mu m$
Länge	$125\ \mu m$	$120 - 130\ \mu m$
Kraftkonstante	$42\ N/m$	$21 - 78\ N/m$
Resonanz-Frequenz	$320\ kHz$	$250 - 390\ kHz$

Liste aller verwendeten Geräte

Particle Tracking

Bildverarbeitung/Kontrolle der Framegrabberkarte

Hersteller: F.I.B.U.S., piccolo Version 3.3

CCD-Kamera

Hersteller: Hitachi, KP-F1 E/K

Computer

700 MHz Intel Celeron, 256 MB RAM, 10 GB Festplatte

Dunkelfeldmikroskop

*Hersteller: PZO, Biolar, Objektiv: LOMO 40fach; n.A.: 0,75, achromatisch;
Wasserimmersion*

Framegrabberkarte

Hersteller: Coreo, Occulus F/65-DSP, 32 MB DRAM

Tabellenkalkulation

Microsoft Excel 97

Microcal Origin 60

Kondensor

Hersteller: PZO, n.A.: 1,2 bis 1,4, Karoidkondensor; Ölimmersion

Kernresonanzspektroskopie

Spektroskop

Hersteller: Bruker, DRX 500

Messkopf

5 mm BB-HR-Messkopf mit auf 19F-getunter 1H-Entkopplerspule

Software

TOPSPIN Fa. Bruker

Rasterkraftmikroskopie

Mikroskop

Hersteller: JPK Instruments, „NanoWizard“

Cantilever

*Hersteller: Nanoworld, Non-Contact-/Tapping-Mode-Cantilever "NanoWorld
Pointprobe NCH"*

Synthese

Analysewaage

Hersteller: Sartorius analytic, A200S

Pumpe

Hersteller: ALITEA

Rotationsverdampfer

Hersteller: Büchi, Rotavapor, R110

Vakuumpumpe

Hersteller: Vacuubrand, CVC 2

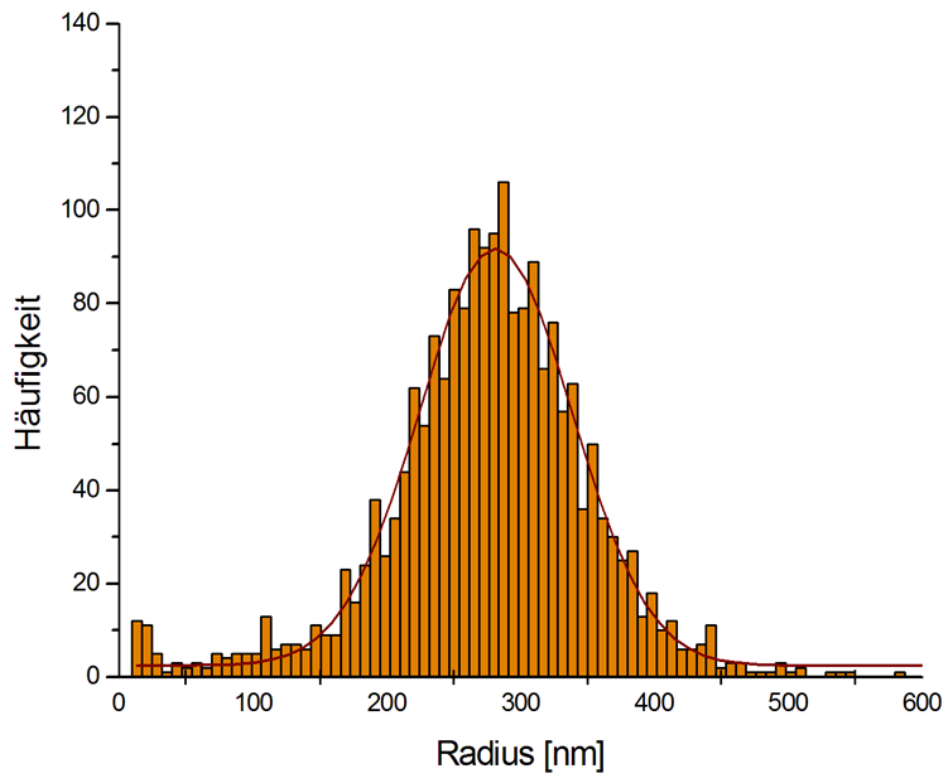
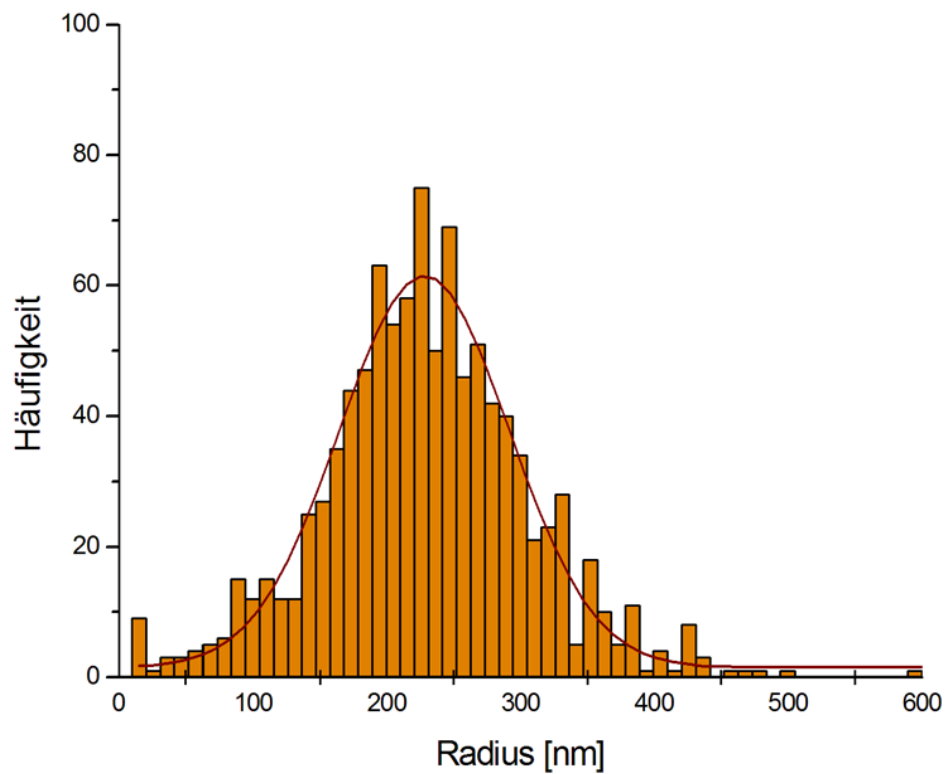
Rotor-Stator-Rührer

Hersteller: IKA Labortechnik, RW16 basic

Ultraschallfinger

Hersteller: Branson, Digital Sonifier W-450 D

Abbildungen

Abbildung 6.1: Größenhistogramm $nk(O)_{PBCA/PFD}$ 1 PT.Abbildung 6.2: Größenhistogramm $nk(O)_{PBCA/PFD}$ 2 PT.

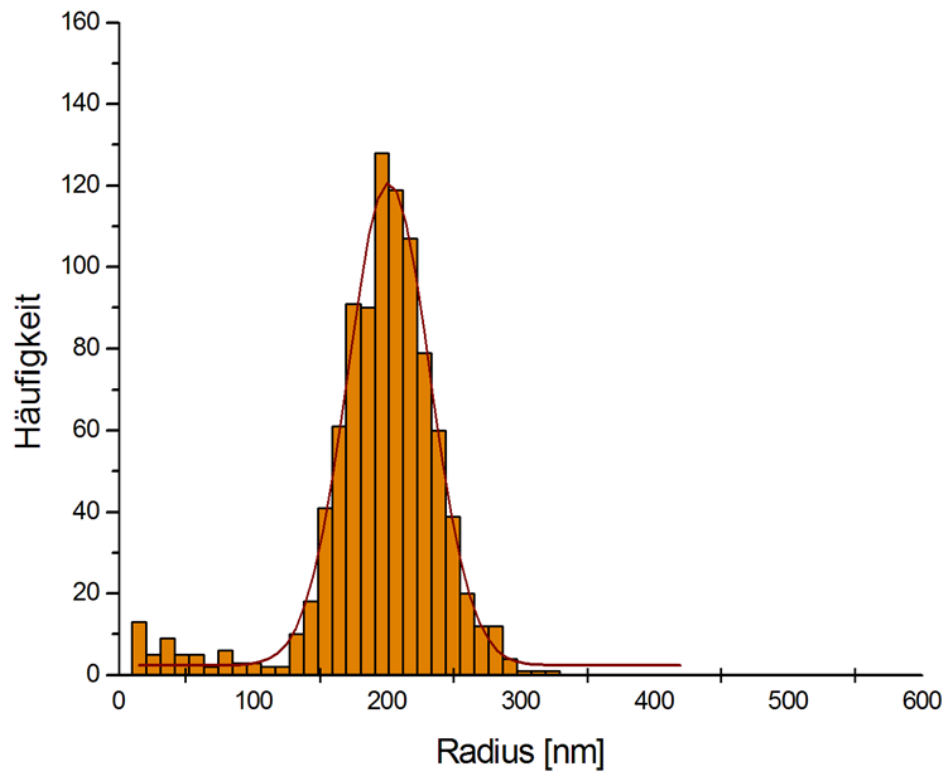


Abbildung 6.3: Größenhistogramm nk(O)_{PBCA/PFD3} PT.

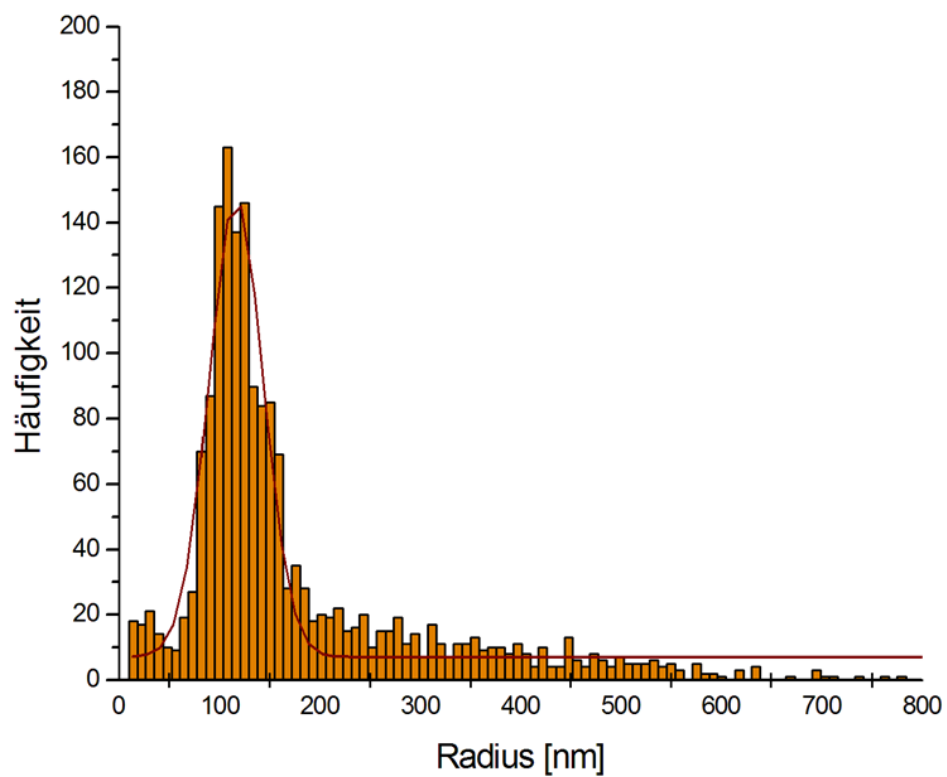
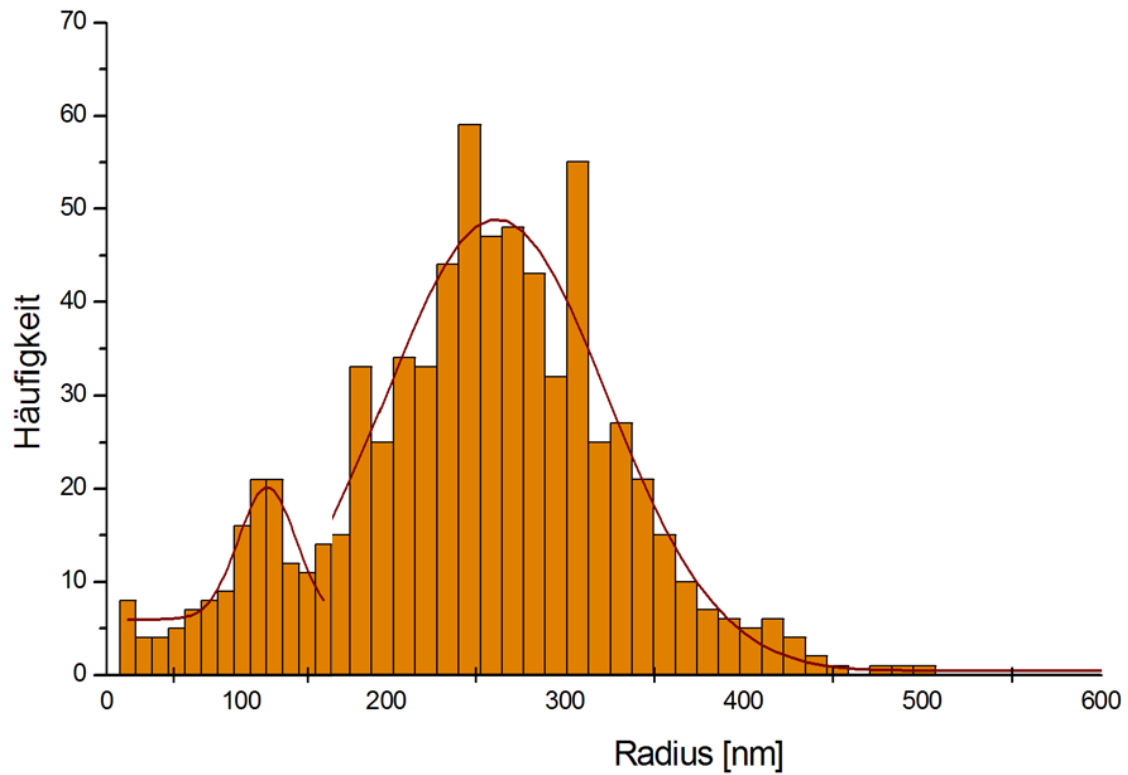
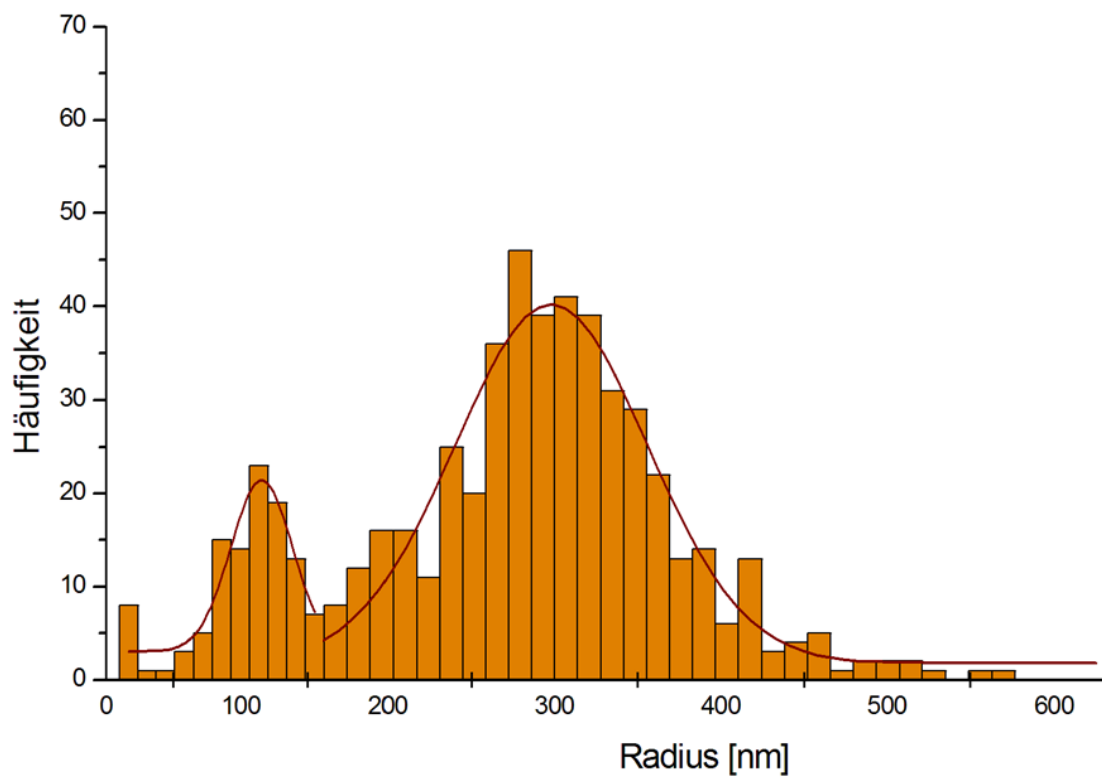


Abbildung 6.4: Größenhistogramm nk(O)_{PLGA/PFD1} PT.

Abbildung 6.5: Größenhistogramm nk(O)_{PLGA/PFD2} PT.Abbildung 6.6: Größenhistogramm nk(O)_{PLGA/PFD3} PT.

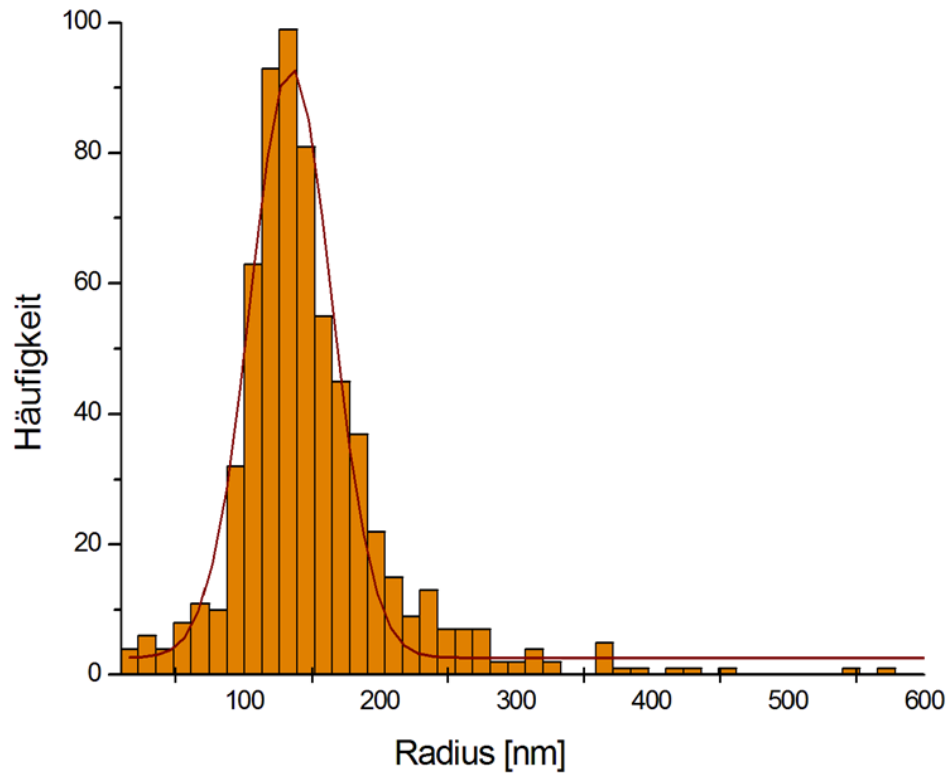


Abbildung 6.7: Größenhistogramm nk(RS)_{PBCA/Miglyol} 1 PT.

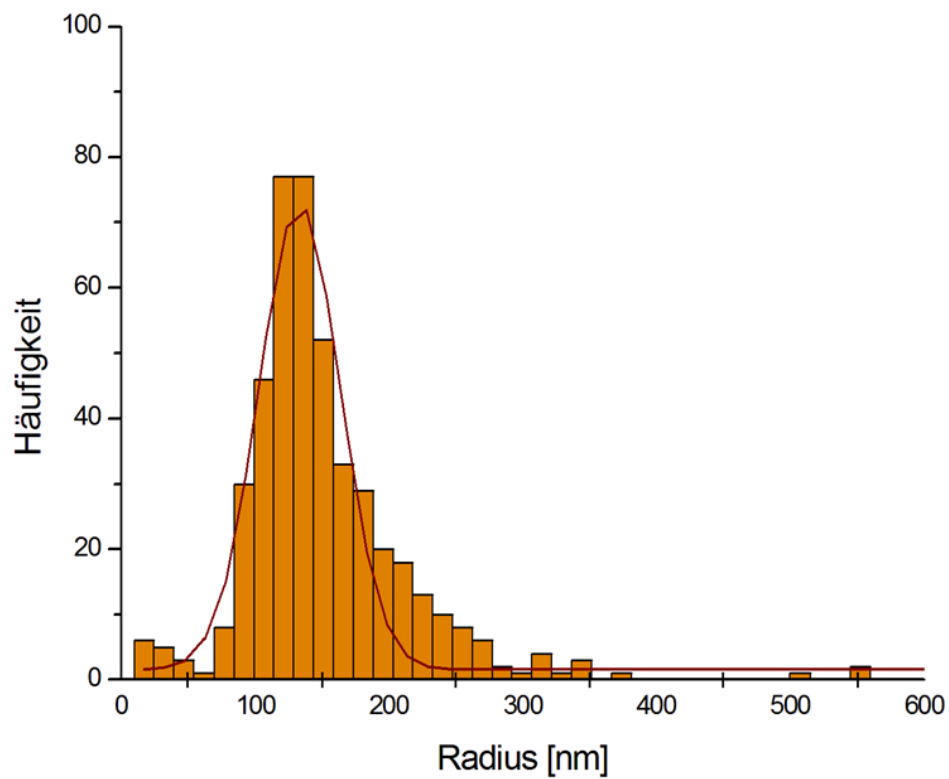


Abbildung 6.8: Größenhistogramm nk(RS)_{PBCA/Miglyol} 2 PT.

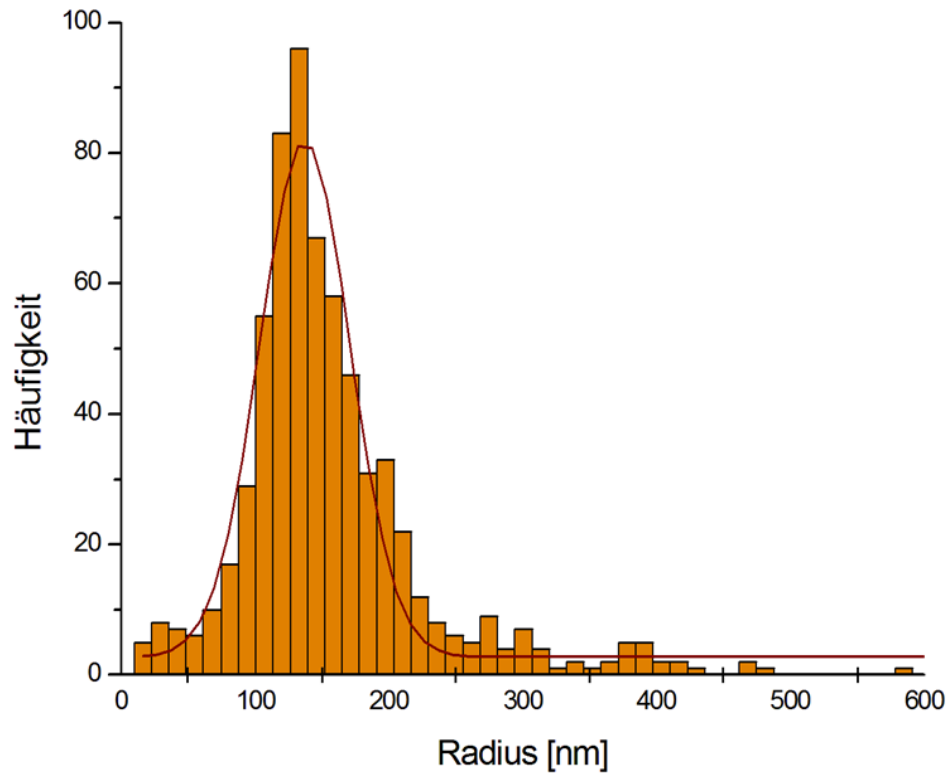


Abbildung 6.9: Größenhistogramm nk(RS)_{PBCA/Miglyol3} PT.

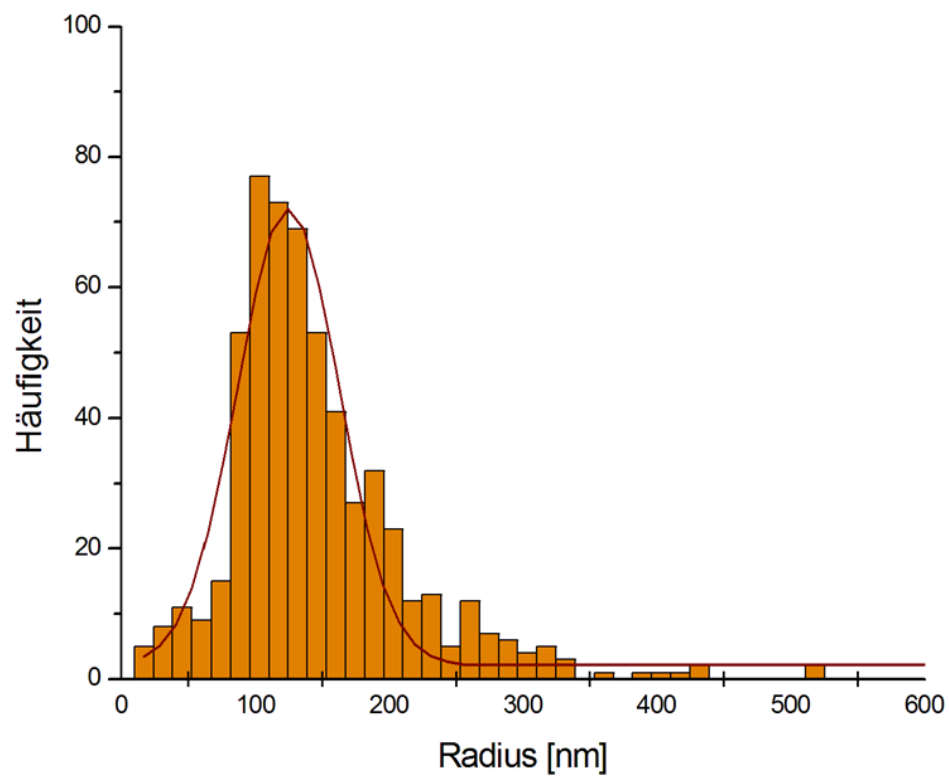


Abbildung 6.10: Größenhistogramm nk(LV)_{PLGA/PFD1} PT.

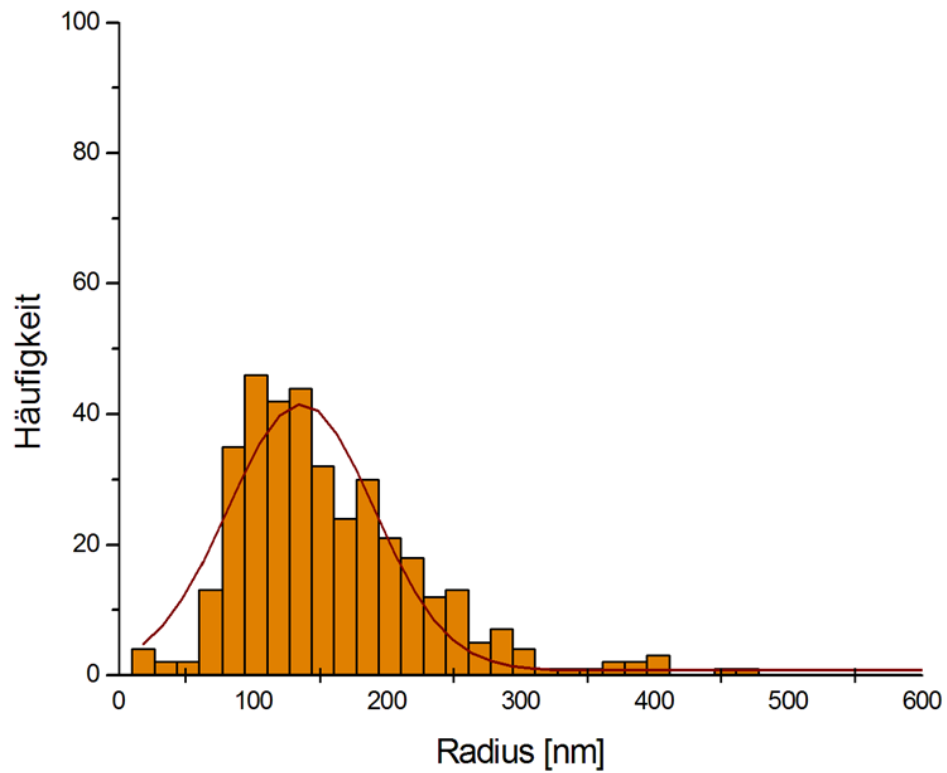


Abbildung 6.11: Größenhistogramm nk(LV)_{PLGA/PFD2} PT.

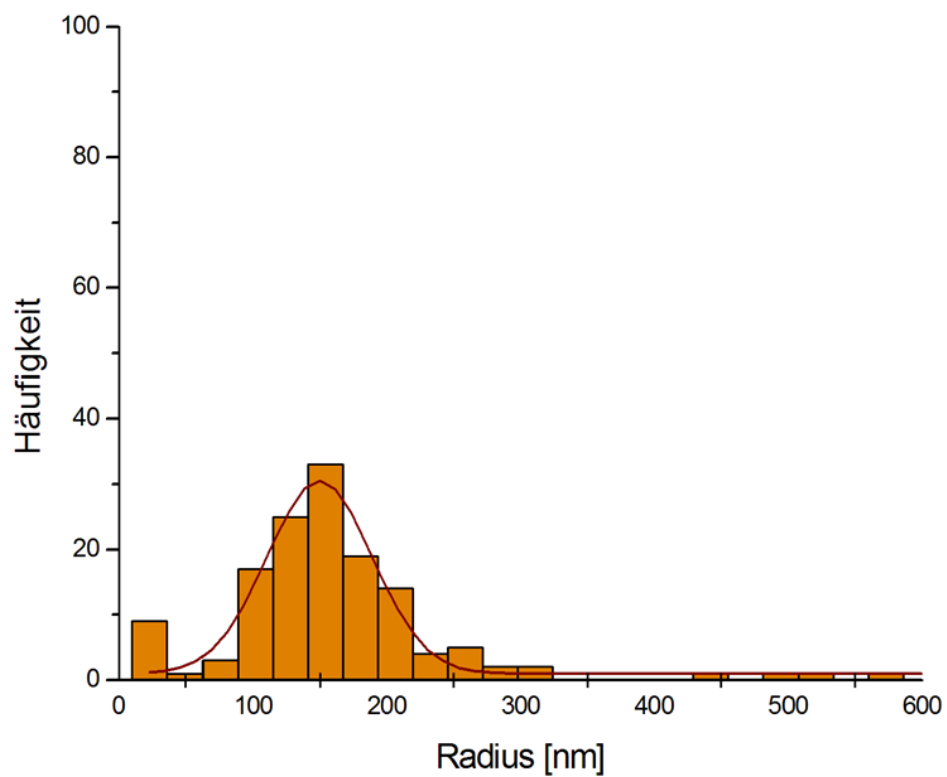


Abbildung 6.12: Größenhistogramm nk(LV)_{PLGA/PFD3} PT.

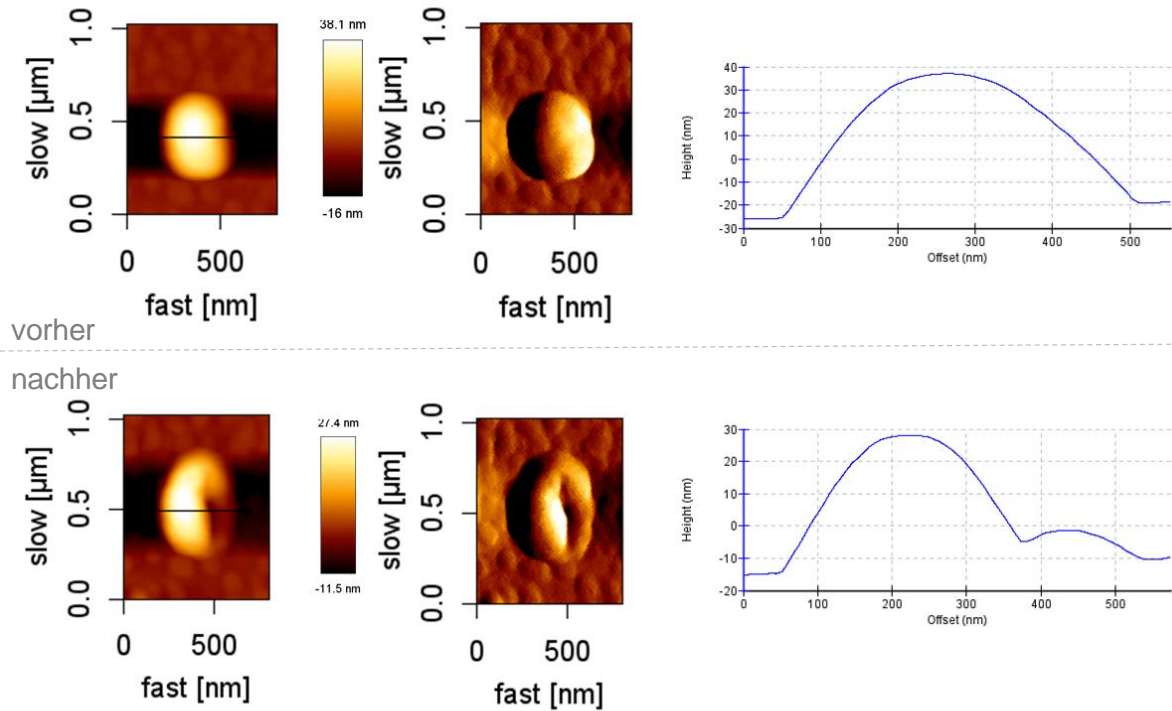


Abbildung 6.13: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $nk(O^{Opt1}a_{11})_{PLGA/PFD}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

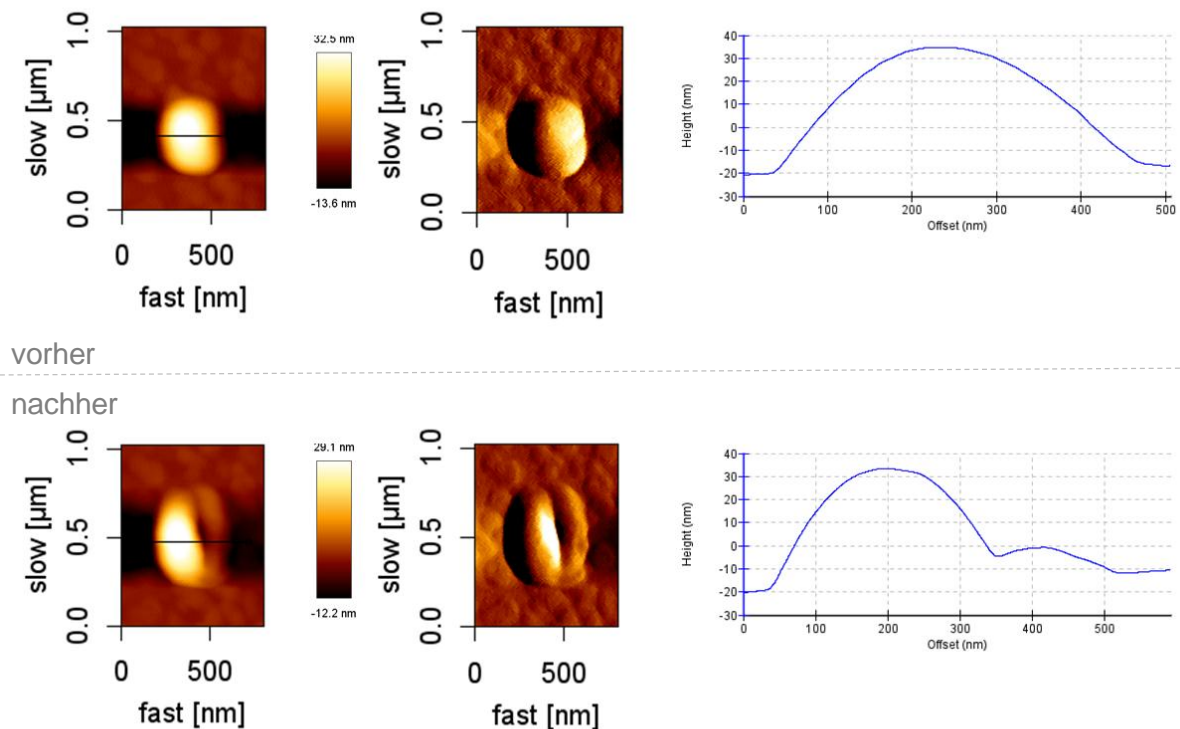
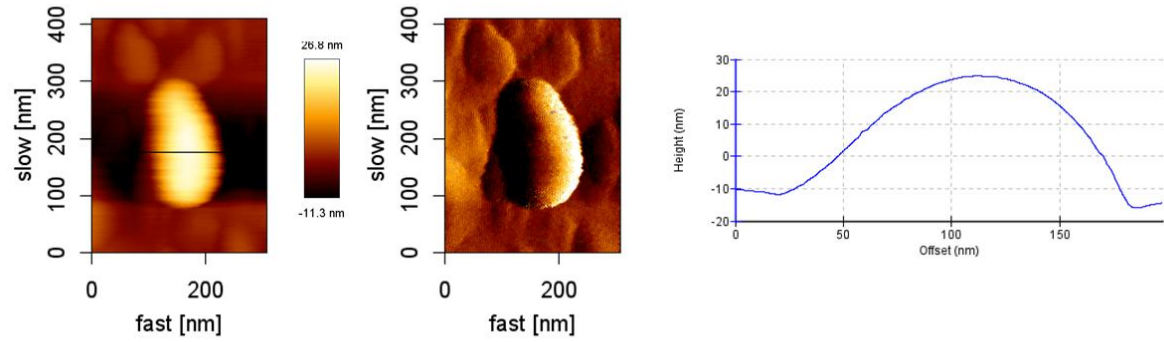


Abbildung 6.14: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $nk(O^{Opt1}a_{11})_{PLGA/PFD}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

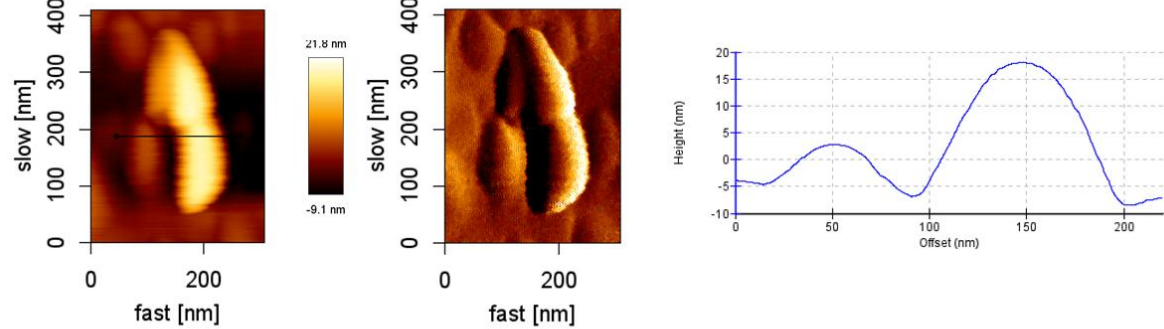
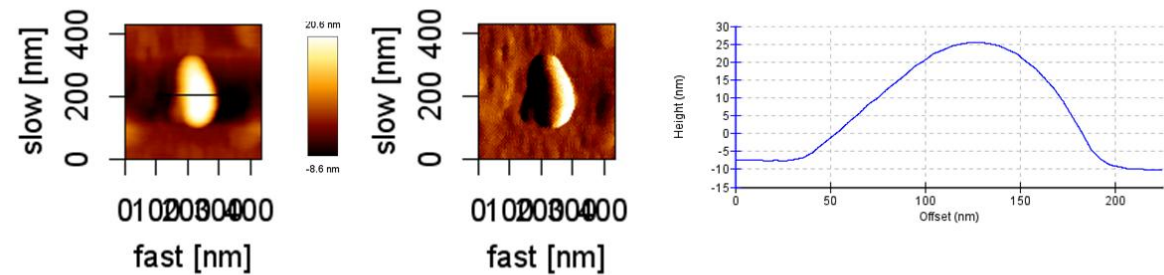


Abbildung 6.15: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opt1}}_{\text{a12}})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

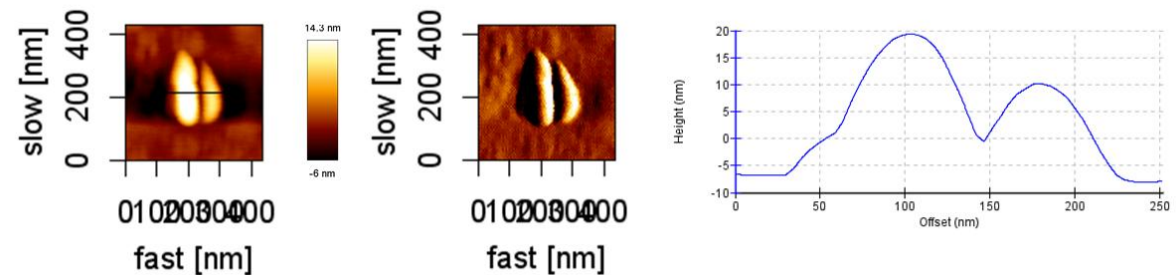
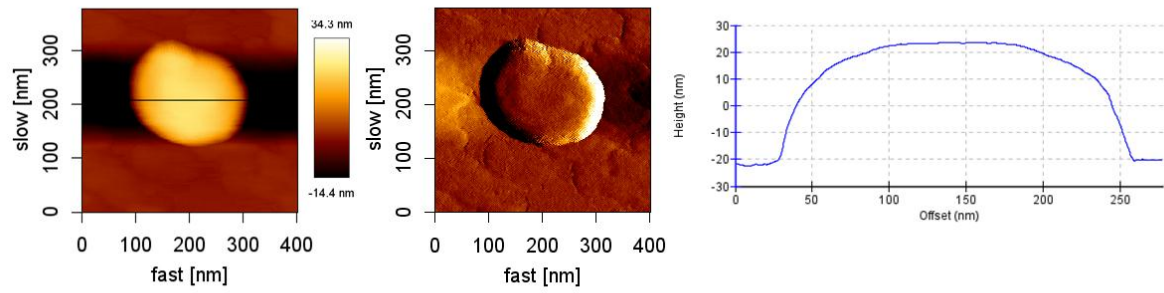


Abbildung 6.16: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opt1}}_{\text{a12}})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

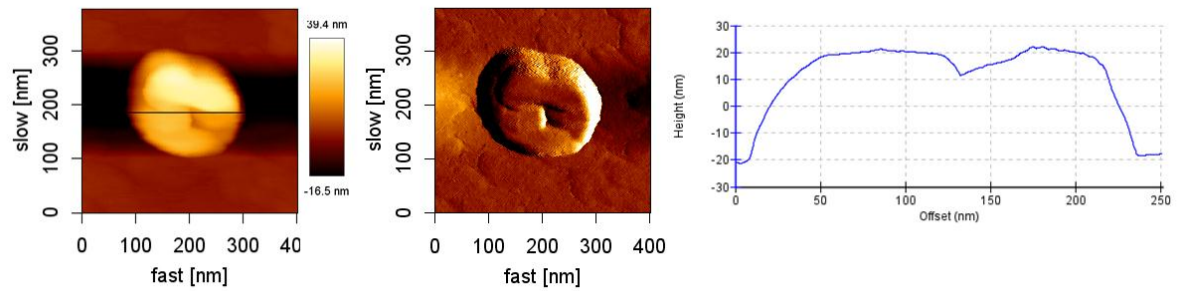
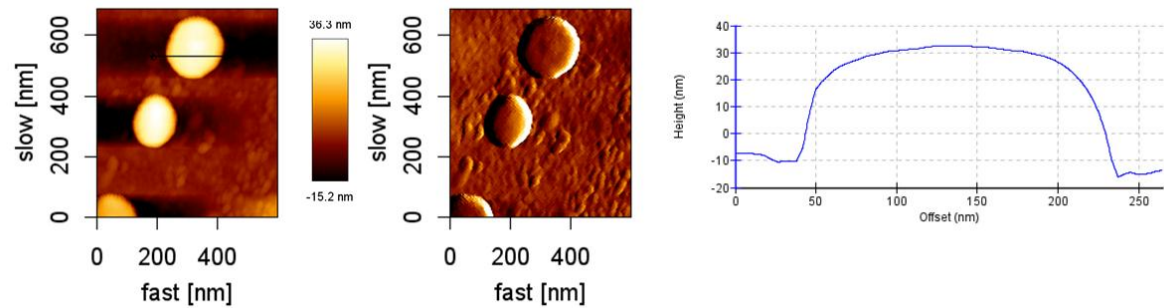


Abbildung 6.17: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $nk(O^{Opt1}_{a13})_{PLGA/PFD}$ AFM1. Von links nach rechts: Höhenbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

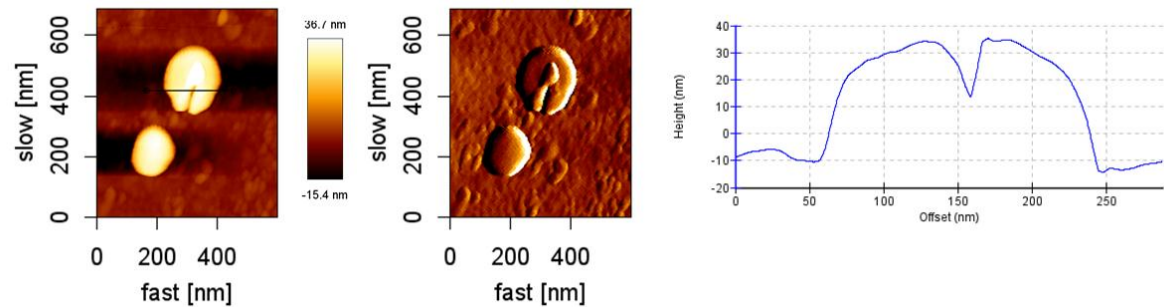
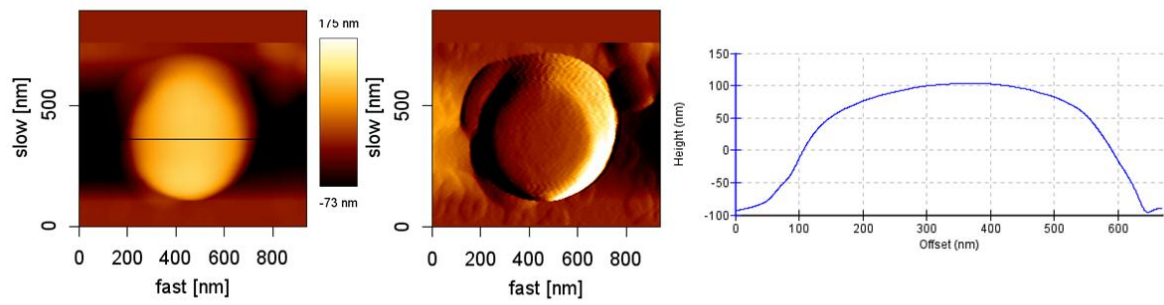


Abbildung 6.18: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $nk(O^{Opt1}_{a13})_{PLGA/PFD}$ AFM2. Von links nach rechts: Höhenbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

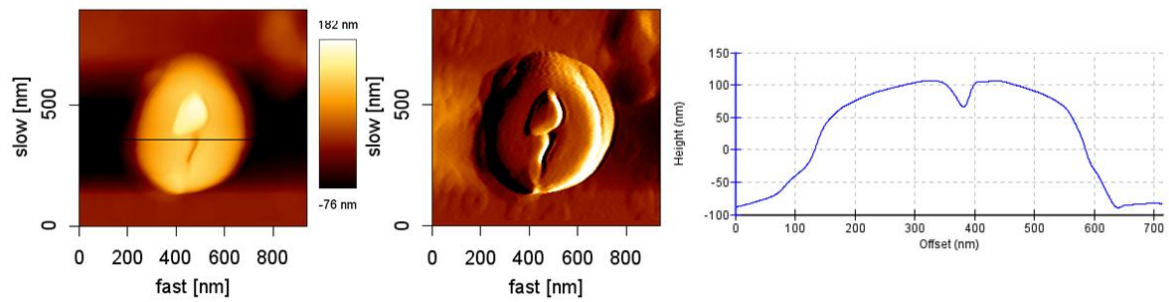
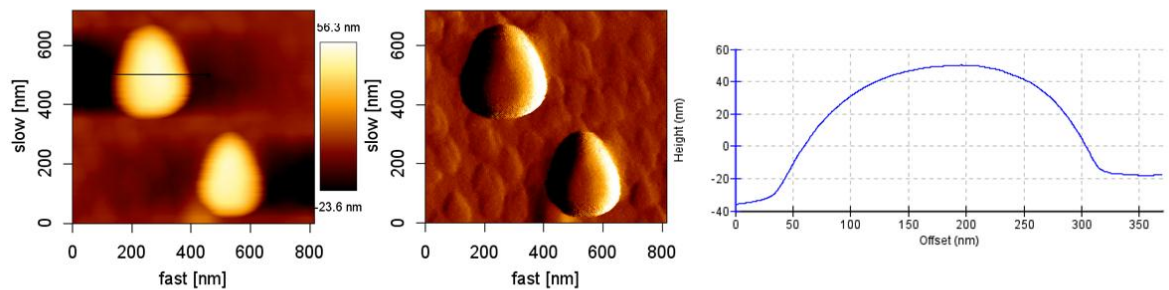


Abbildung 6.19: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $nk(O^{Opt1}_{a21})_{PLGA/PFD}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

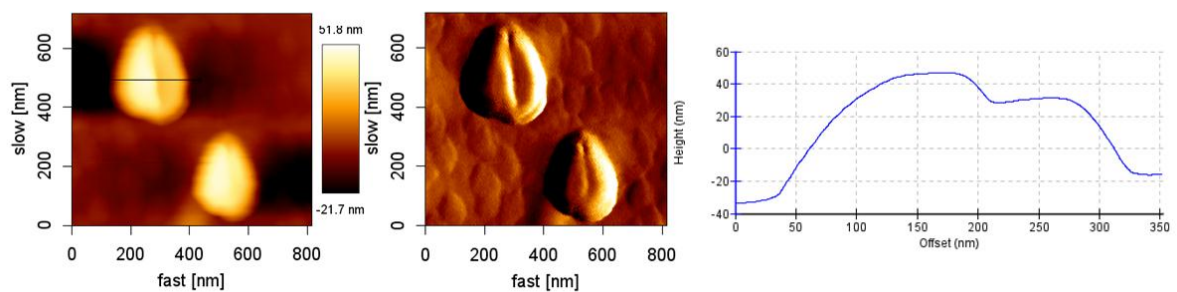
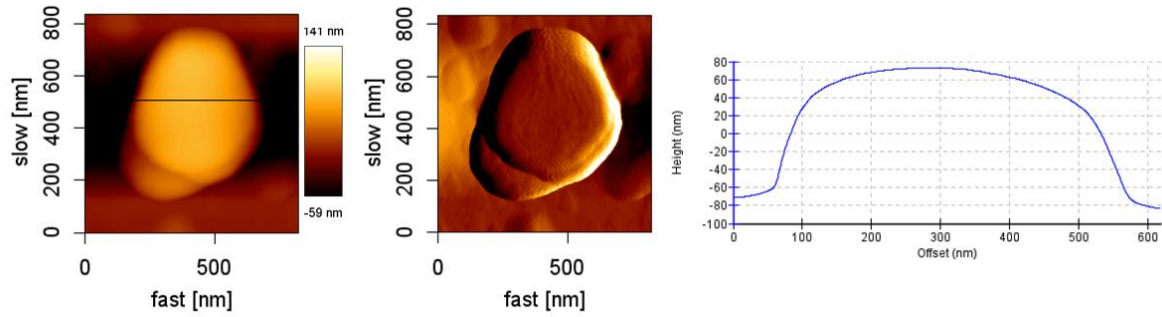


Abbildung 6.20: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $nk(O^{Opt1}_{a21})_{PLGA/PFD}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

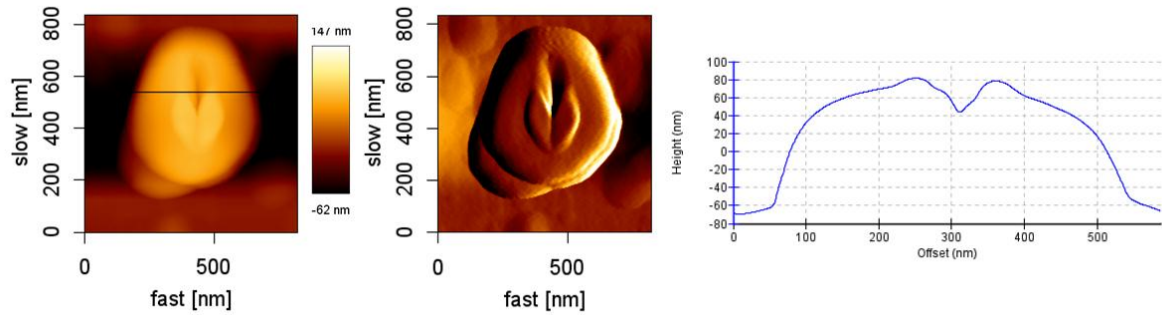
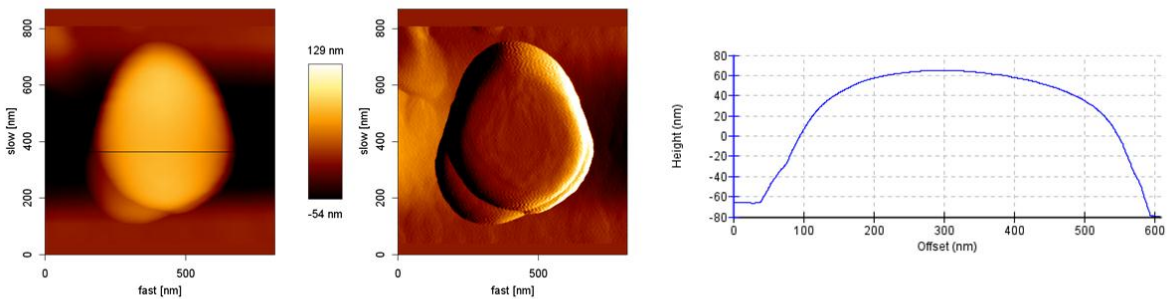


Abbildung 6.21: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opt1}}_{\text{a22}})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

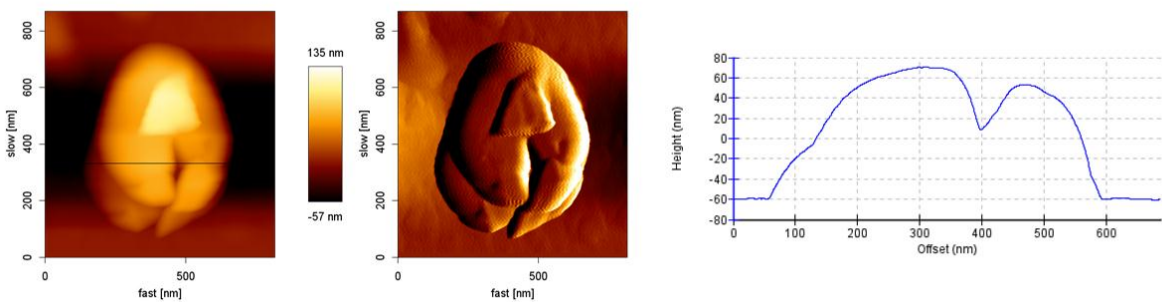
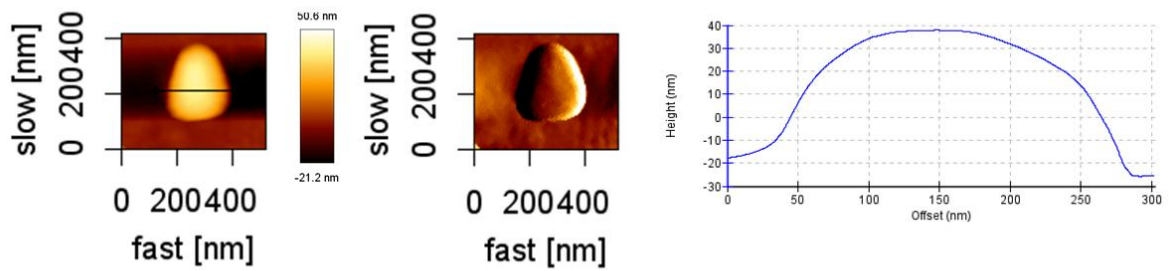


Abbildung 6.22: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opt1}}_{\text{a22}})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

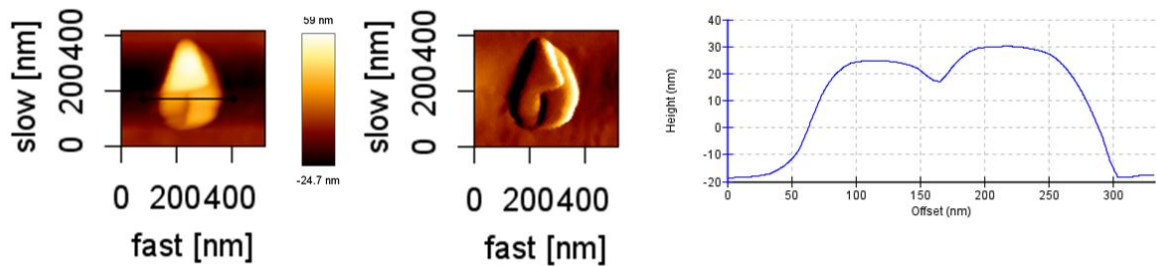
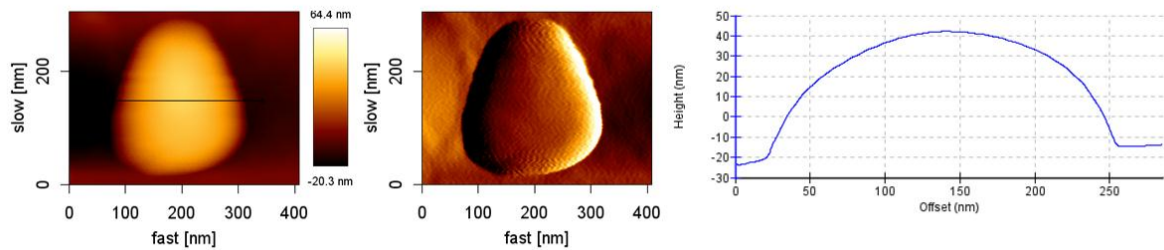


Abbildung 6.23: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opt1}}_{\text{a23}})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

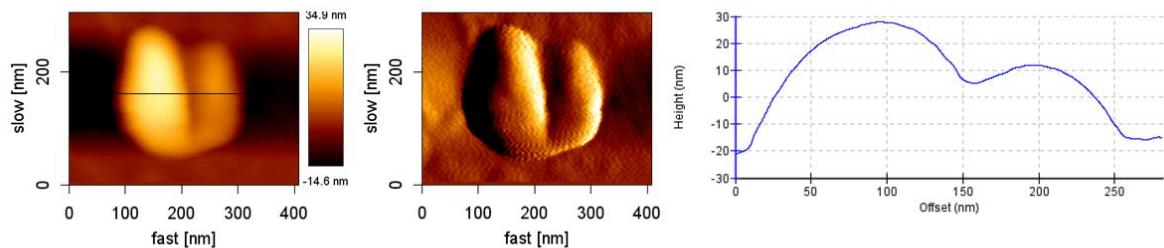
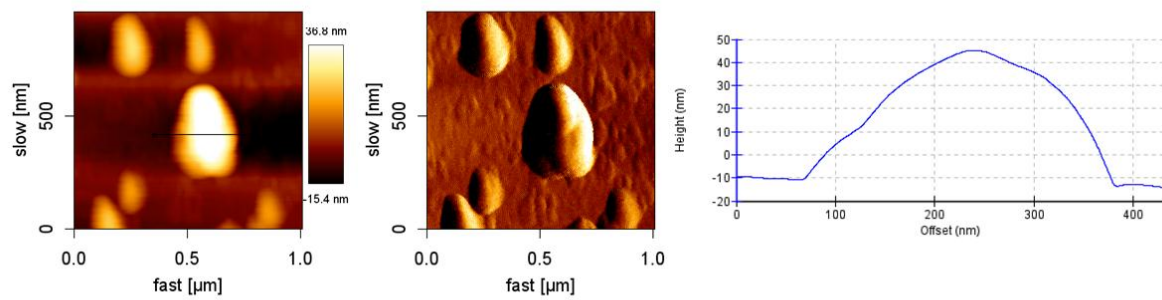


Abbildung 6.24: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opt1}}_{\text{a23}})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

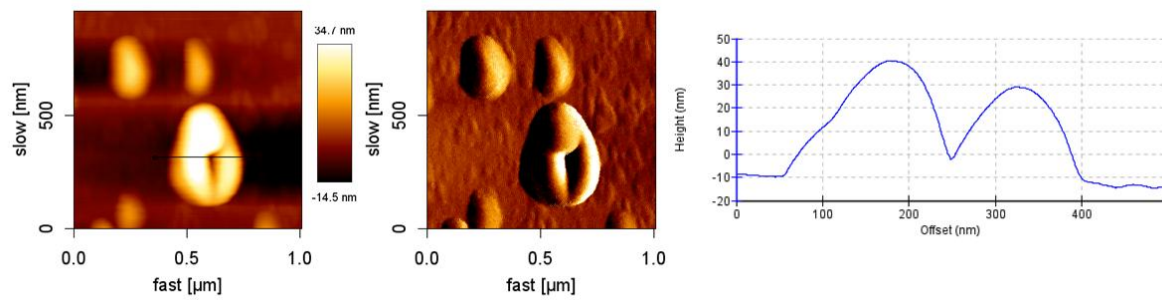
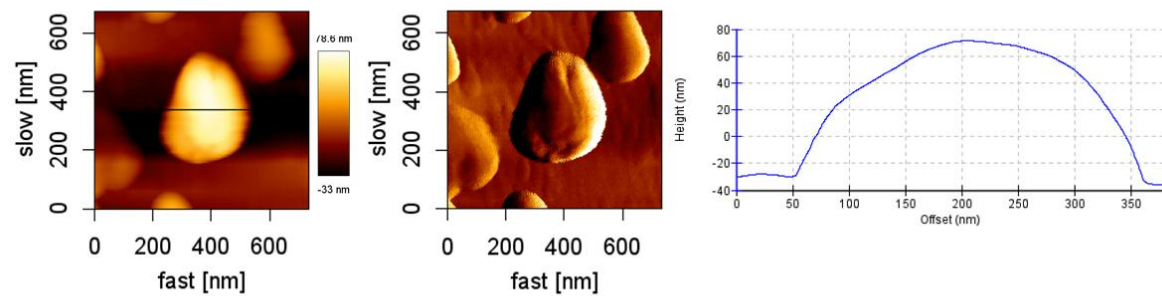


Abbildung 6.25: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $nk(O^{Opt1}a_{31})_{PLGA/PFD}$ AFM1. links: Heightbild, mitte: Errorbild, rechts: Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

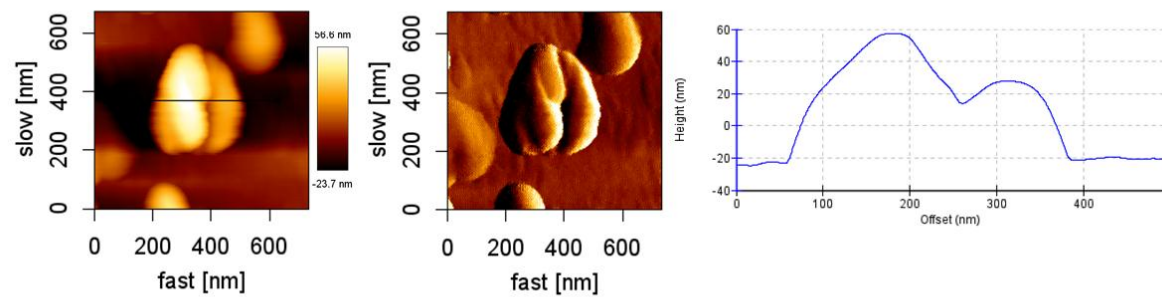
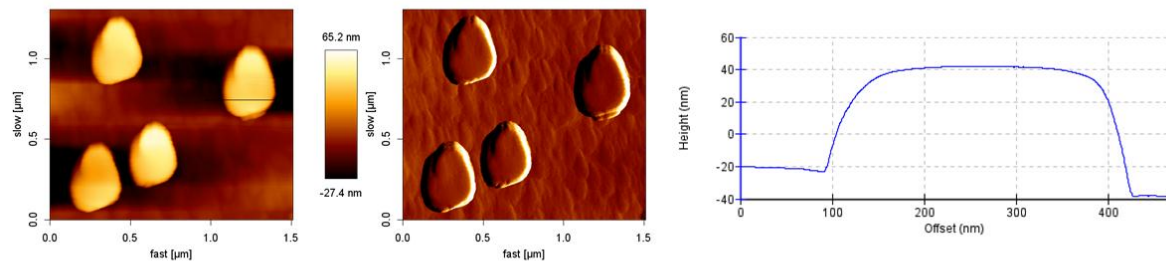


Abbildung 6.26: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $nk(O^{Opt1}a_{31})_{PLGA/PFD}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

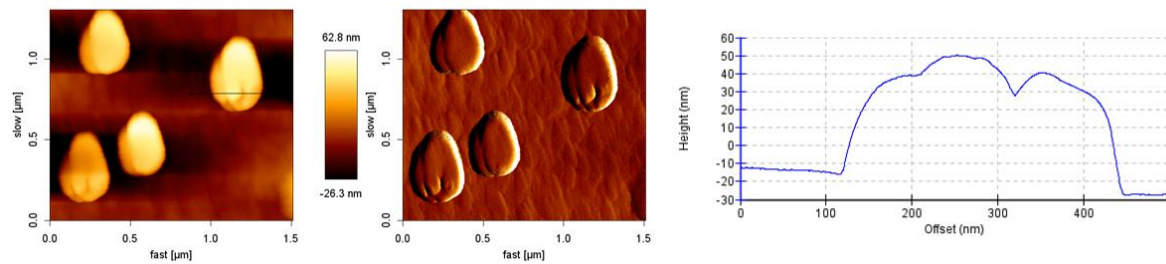
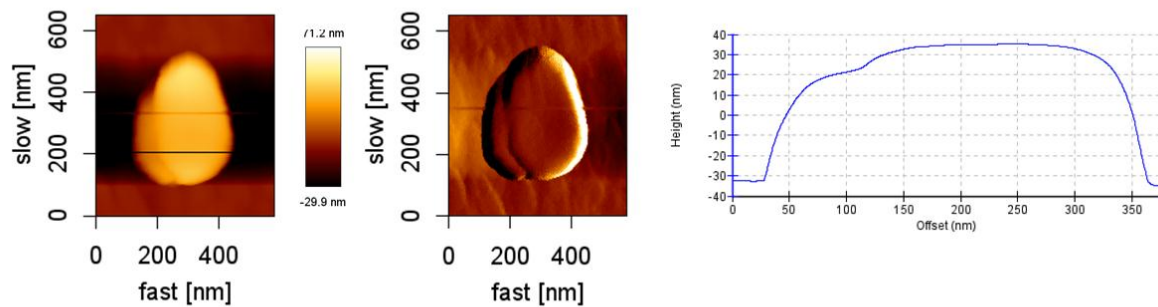


Abbildung 6.27: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $nk(O^{\text{Opti1}}_{a32})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

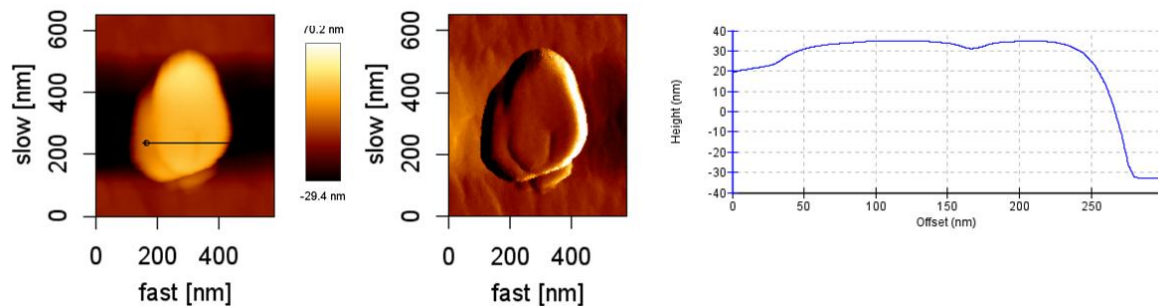
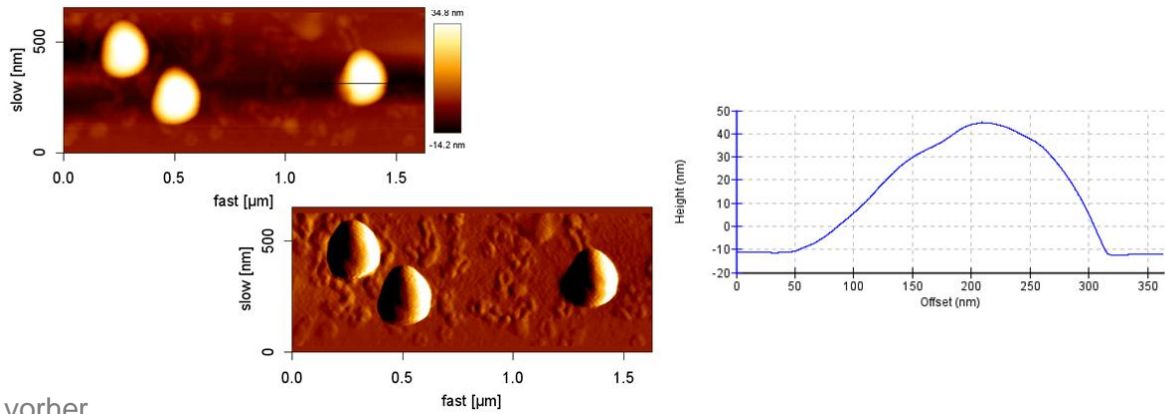


Abbildung 6.28: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrückversuchs an $nk(O^{\text{Opti1}}_{a32})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

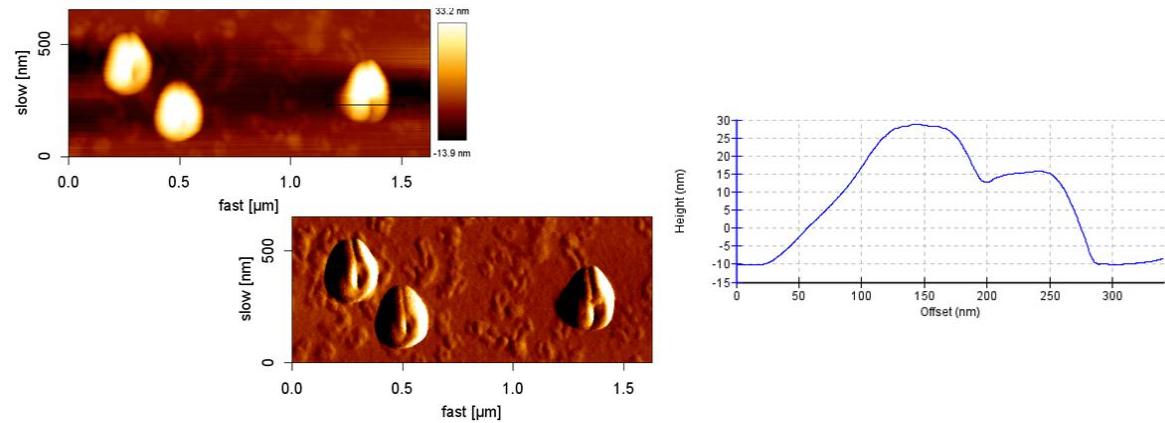
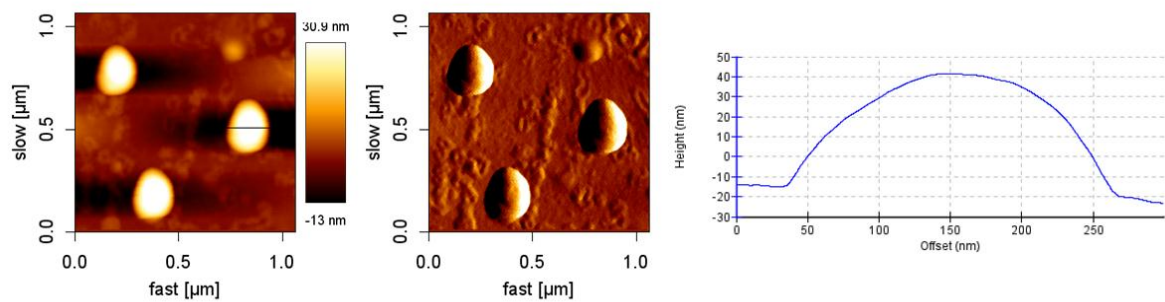


Abbildung 6.29: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM1. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).



vorher

nachher

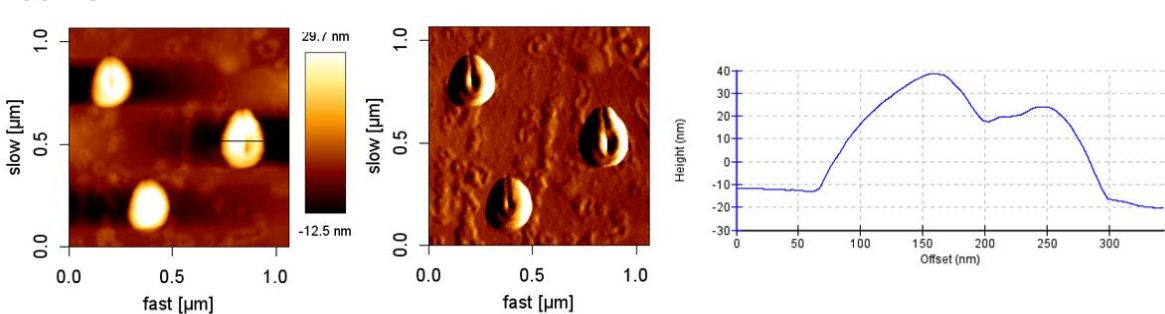


Abbildung 6.30: Vorher-Nachher-Aufnahme eines Eindrucksversuchs an $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}\text{a}_{33})_{\text{PLGA/PFD}}$ AFM2. Von links nach rechts: Heightbild, Errorbild, Höhenprofil (Cross-Section).

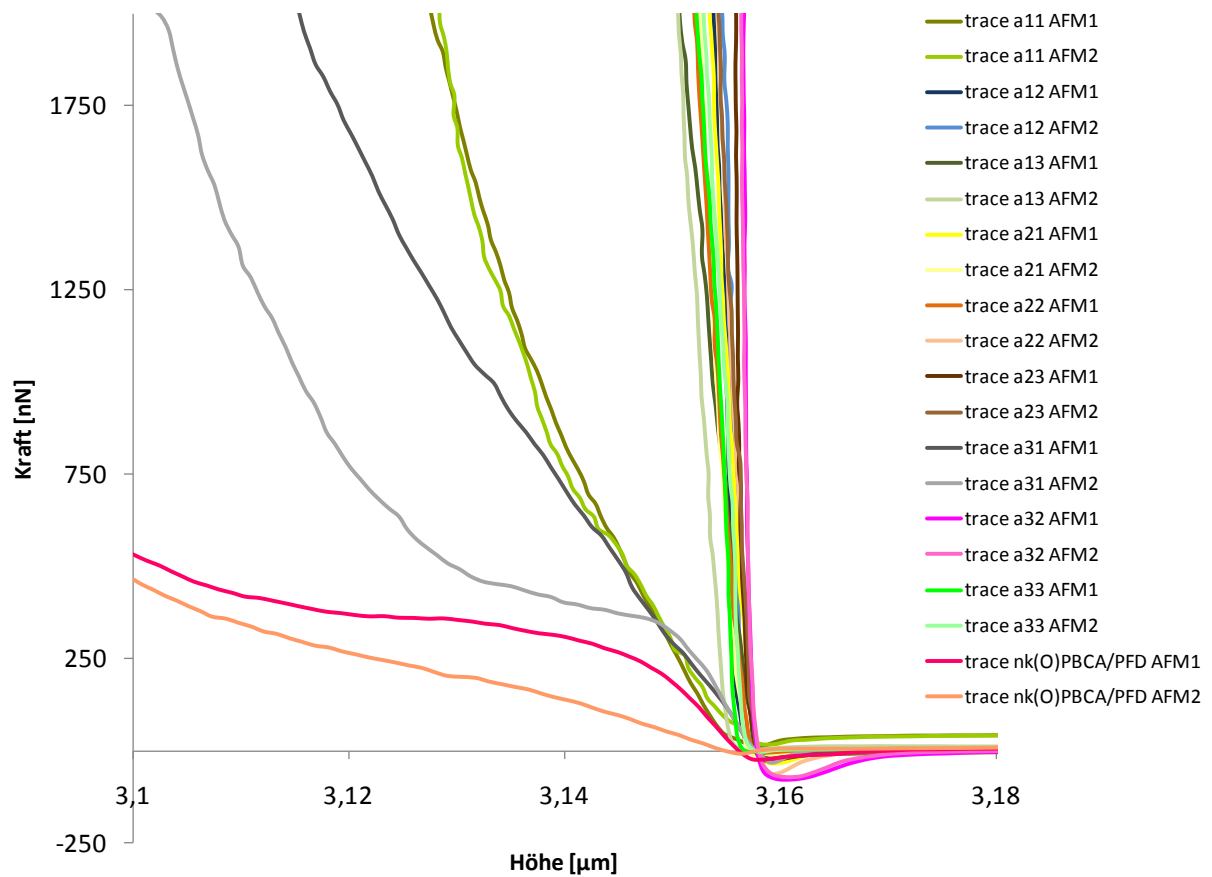


Abbildung 6.31: Vergleich der Anfangssteigungen der Kraftkurven der Proben $\text{nk}(\text{O}^{\text{Opti1}}_{\text{a}_{ij}})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Optimierung 1 mit den Anfangssteigungen der Kraftkurven der Proben $\text{nk}(\text{O})_{\text{PBCA/PFD}}$ der Muttersynthese.

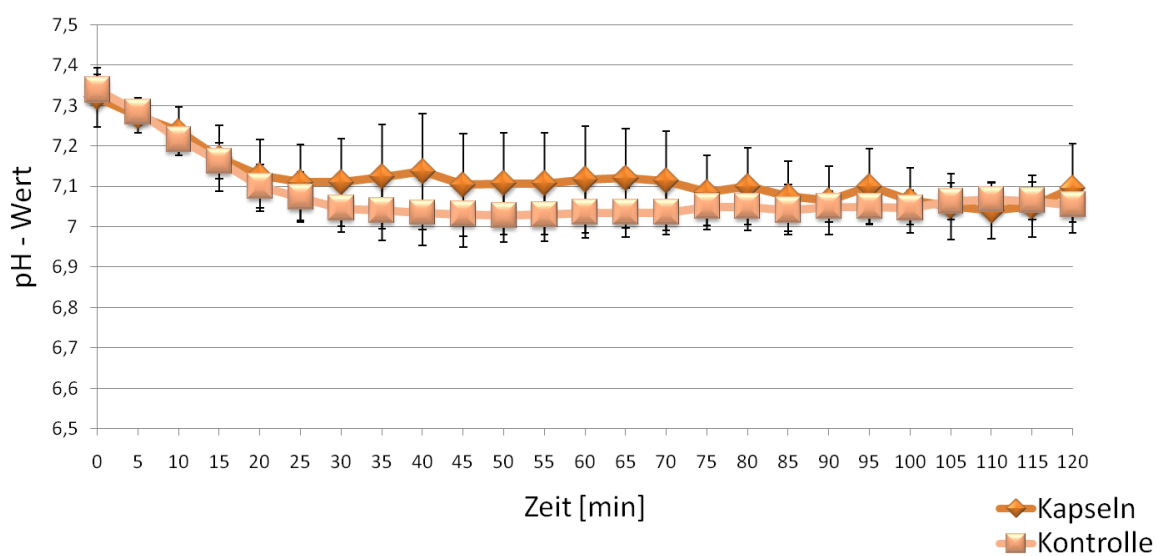


Abbildung 6.32: Zeitlicher Verlauf des pH-Wertes während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

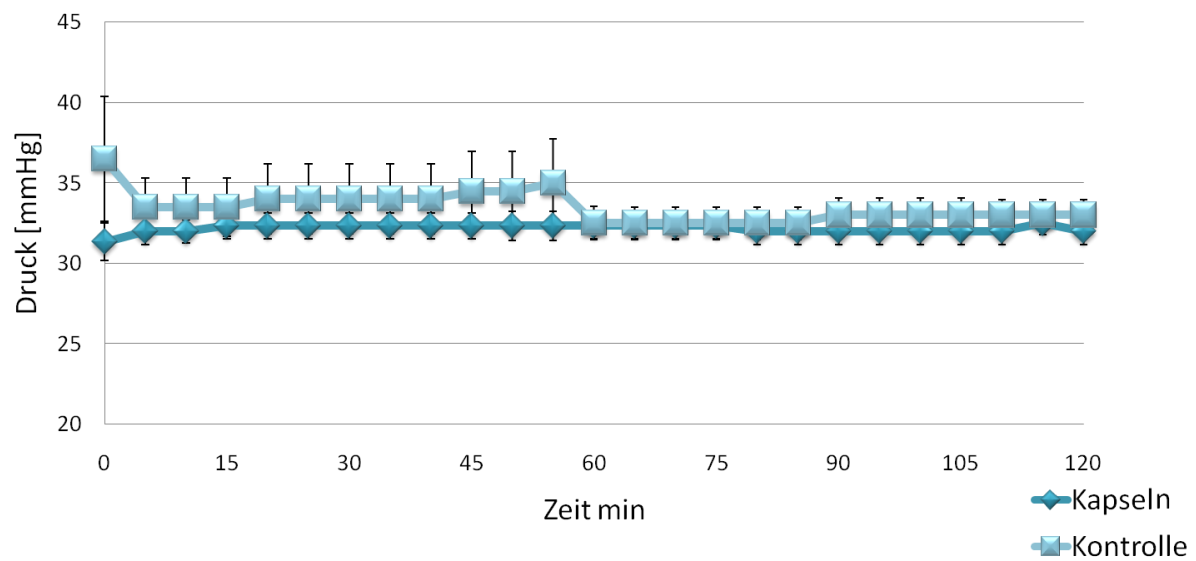


Abbildung 6.33: Zeitlicher Verlauf des Perfusionsdrucks während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

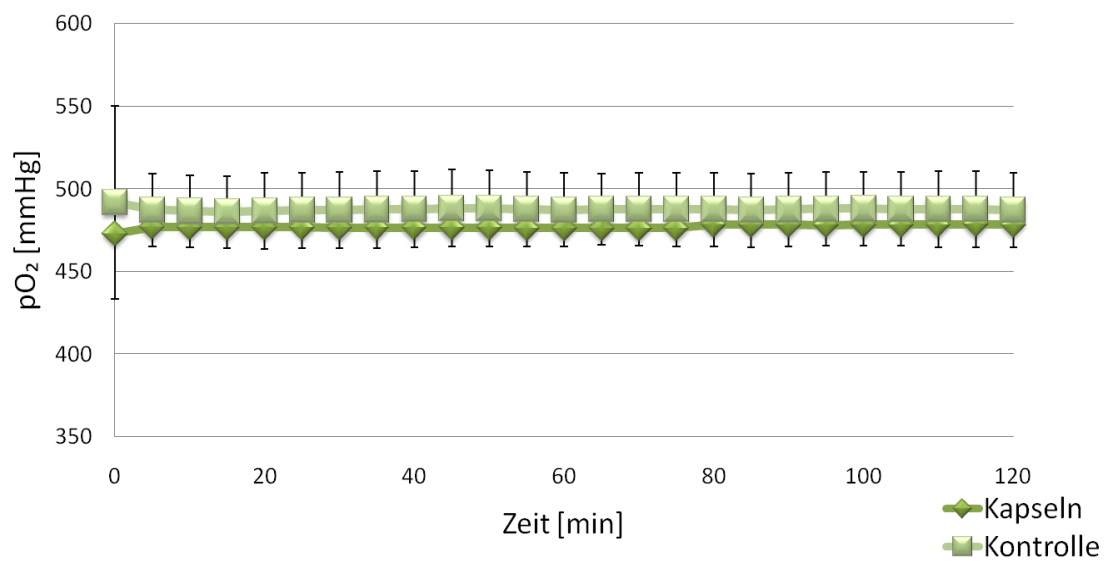


Abbildung 6.34: Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks bevor das Medium die Leber passiert, gemittelt über alle vier Durchläufe.

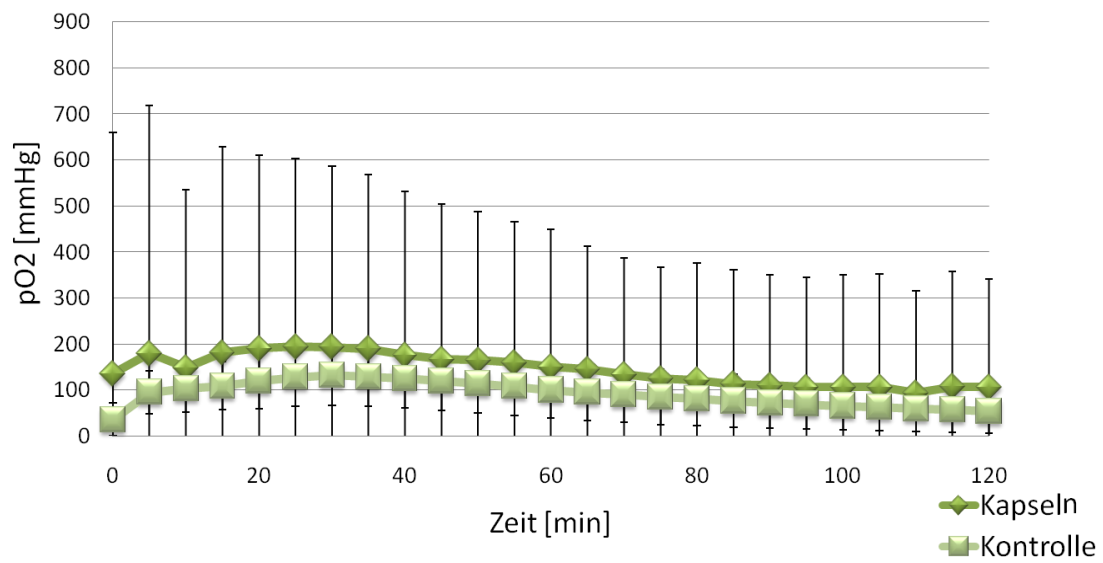


Abbildung 6.35: Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks nachdem das Medium die Leber passiert hat, gemittelt über alle vier Durchläufe.

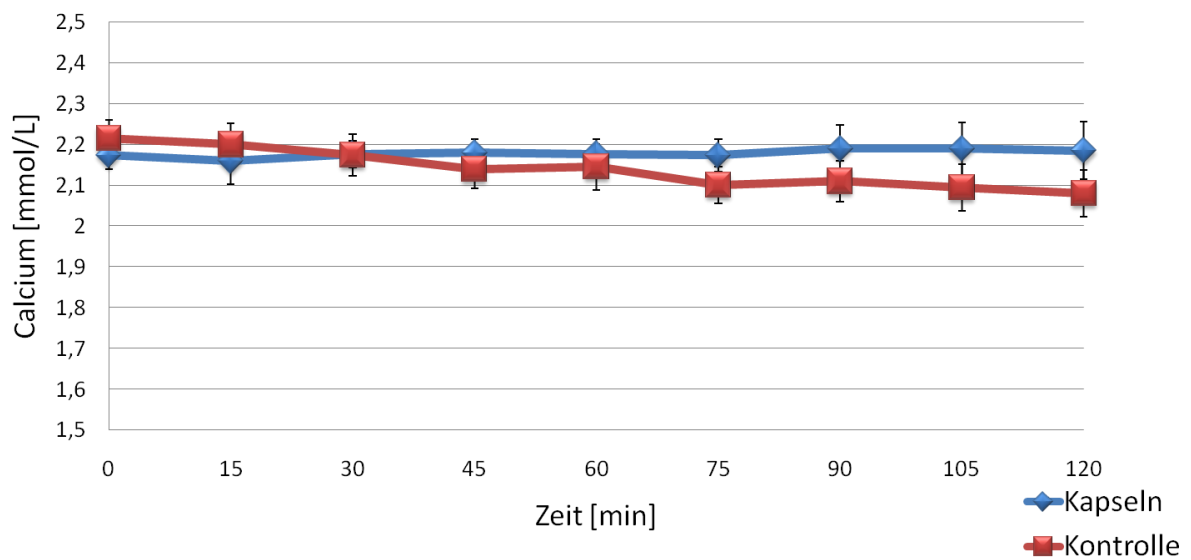


Abbildung 6.36: Zeitlicher Verlauf der Calciumionenkonzentration während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

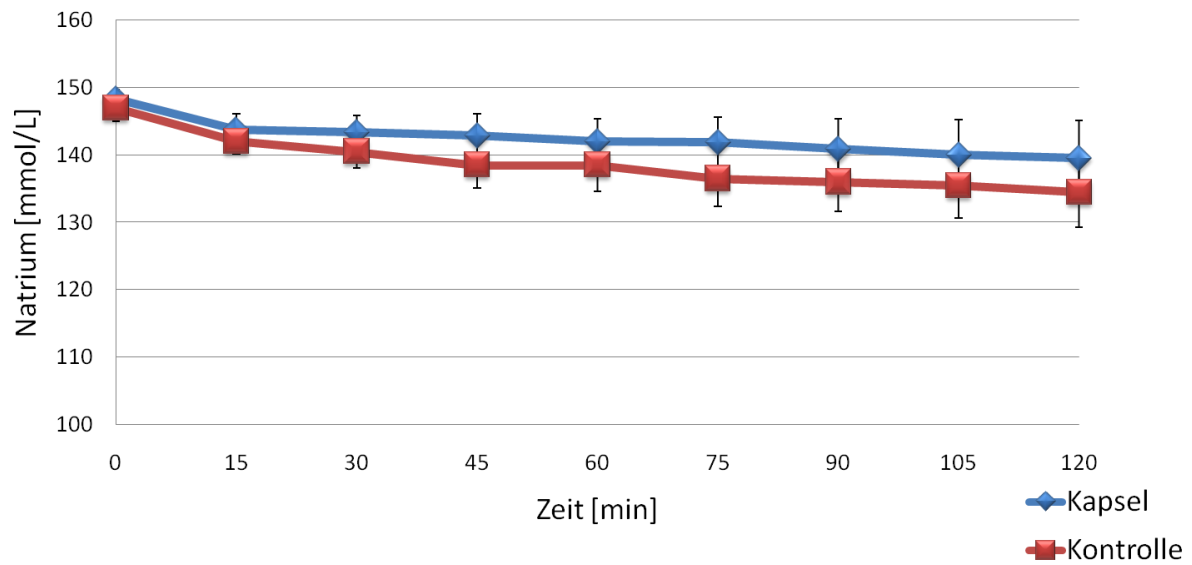


Abbildung 6.37: Zeitlicher Verlauf der Natriumionenkonzentration während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

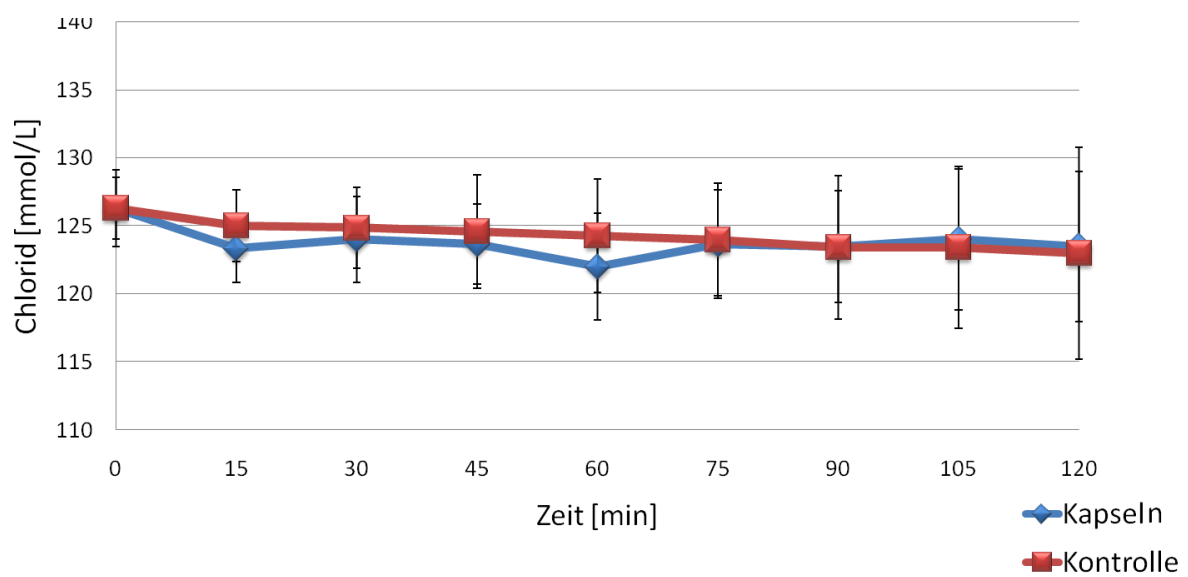


Abbildung 6.38: Zeitlicher Verlauf der Chloridkonzentration während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

Anhang

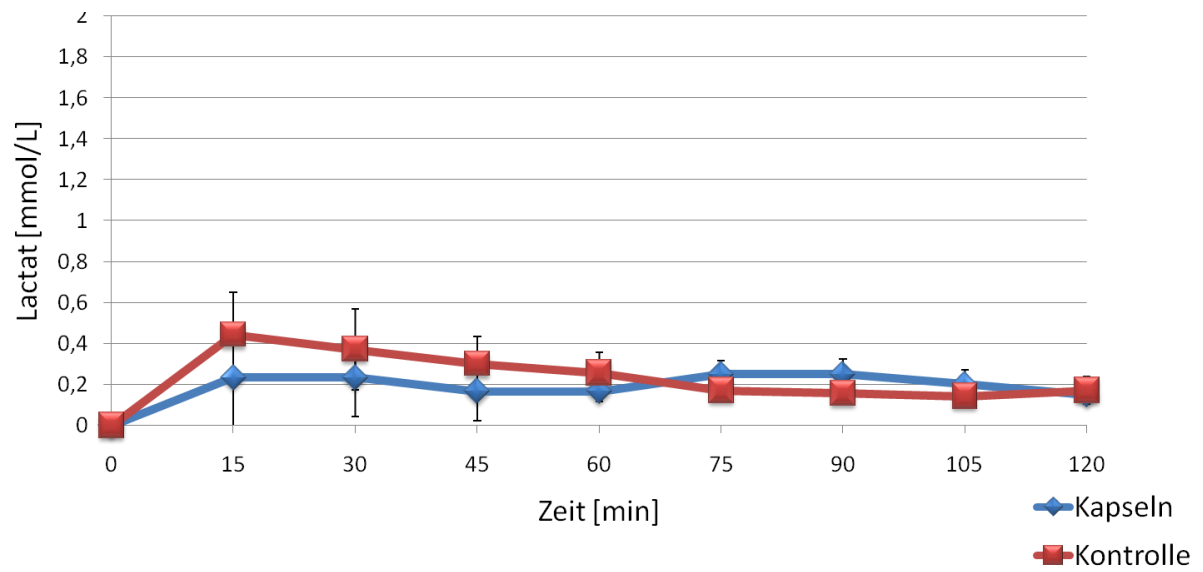


Abbildung 6.39: Zeitlicher Verlauf der Lactatkonzentration während der Leberperfusion, gemittelt über alle vier Durchläufe.

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Ärzte Zeitung online.** <http://www.aerztezeitung.de/panorama/article/586588/aerzte-grenzen-rufen-blutspenden-haiti.html?sh=8&h=-669776620>; 29.01.2010.
- [2] **Online Focus.** http://www.focus.de/panorama/welt/gesundheit-rotes-kreuz-massiver-mangel-an-blutkonserven_aid_531389.html; 17.07.2010.
- [3] **United Nations – Press Conference.**
http://www.un.org/News/briefings/docs//2010/100325_DESA.doc.htm; 02.11.2010.
- [4] **United Nations, Department of Economic and Social Affairs.**
http://esa.un.org/unpd/wpp2008/pdf/WPP2008_PressRelease.pdf; 02.11.2010.
- [5] **Bundeszentrale für politische Bildung.** <http://www.bpb.de/files/MUEY95.pdf>;
02.11.2010.
- [6] **World Health Organization.** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>;
02.11.2010.
- [7] **World Health Organization.** <http://www.who.int/bloodsafety/FactFile2009.pdf>;
02.11.2010.
- [8] **Habler O., Pape A., Meier J., Zwißler B.;** Künstliche Sauerstoffträger als Alternative zur Bluttransfusion; *Anaesthesist*, 54, 741-754, 2005.
- [9] **Reid T. J.;** Hb-based oxygen carriers: are we there yet?; *Transfusion*, 43, 280–287, 2003.
- [10] **Shaw R. F., Richard T. J.;** Rational Development of Oxyfluor™; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [11] **Al Khouri Fallouh N., Roblot-Treupel L., Fessi H., Devissaguet J. Ph., Puisieux F.;** Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules; *Int. J. Pharm.*, 28, 125–132, 1986.
- [12] **Couvreux P., Vauthier C.;** Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives; *J. Controlled Release*, 17, 187–198, 1991.
- [13] **Winslow R. M.;** Historical Background; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.

- [14] **Rossi E. C., Simon T. L.;** Transfusion in the New Millenium; Rossi's Principles of Transfusion Medicine, Simon T. L., Snyder E. L., Solheim B. G., Stowell C. P., Strauss R. G., Petrides M., Wiley-Blackwell, 4th edn., 2009.
- [15] **Mueller-Eckhardt C., Kiefel V.;** Transfusionsmedizin; Springer, Berlin Heidelberg New York, 3. Auflage, 2004.
- [16] **Barsoum N., Kleeman C.;** Now and Then, the History of Parenteral Fluid Administration; Am. J. Nephrol., 22, 284–289, 2002.
- [17] **Gaius Plinius Secundus d. Ä., König R., Winkler G.;** Plinius Naturkunde • Buch 28 • Medizin und Pharmakologie • Heilmittel aus dem Tierreich; Artemis Verlag München und Zürich, München, 1988.
- [18] **Key J. D., Keys T. E., Callahan J. A.;** Historical Development of Concept of Blood Circulation • An Anniversary Memorial Essay to William Harvey; The American Journal of Cardiology, 43, 1026–1032, 1979.
- [19] **Harvey W.;** The Anatomical Exercises • De Mortu Cordis and De Circulatione Sanguinis in English Translation; Keynes G., Dover Publications, New York, 1995.
- [20] **Benedum J.;** Historische Entwicklung der Bluttransfusion; Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther., [Suppl. 2] 36, 83–86, 2001.
- [21] **Walton M. T.;** „The first blood transfusion: French or English?"; Medical History, 18 (4), 360–364, 1974.
- [22] **Rump G., Braun R., Jahn U.-R., Krakowitzky P., Sibrowski W., Van Aken H.;** Transfusionsmedizin compact, Thieme, Stuttgart, 2003.
- [23] **Ottenberg R.;** Studies in Isoagglutination: I. Transfusion and the Question of Intravaskular Agglutination; The Journal of Experimental Medicine, 13, 425–438, 1911.
- [24] **Winslow R. M.;** Clinical Physiology: Oxygen Transport and the Transfusion Trigger; Blood Sustitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [25] **Lowe K. C.;** Blood substitutes: from chemistry to clinic; J. Mater. Chem., 16, 4189–4196, 2006.
- [26] **Marino P. L.;** Das ICU-Buch • Praktische Intensivmedizin; Taeger K., Elsevier GmbH Urban & Fischer, München, 4. Auflage, 2008.

- [27] **Ward J. P. T., Ward J., Leach R. M., Wiener C. M.;** The Respiratory System at a Glance; Blackwell Publishing, Second Edition, 2006.
- [28] **Bellelli A., Brunori M.;** The Structural and Functional Properties of Hemoglobin and their Relevance for a Hemoglobin-Based Blood Substitute; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [29] **Benz C.;** Physikum EXAKT • Das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP; Emminger H., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 4. Überarbeitete und aktualisierte Auflage, 2005.
- [30] **Abdulla W.;** Interdisziplinäre Intensivmedizin; Elsevier GmbH Urban & Fischer, München, 3. Auflage, 2007.
- [31] **Chang T. M. S.;** Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials; Karger Landes Systems, Basel, 1997.
- [32] **Madjdpour C., Heindl V., Spahn D. R.;** Risks, benefits, alternatives and indications of allogenic blood transfusions; Minerva Anesthesiol., 72 (5), 283–298, 2006.
- [33] **Biorama.** <http://www.biorama.ch/biblio/b50chem/k06saba/saba050.htm>; 21.07.2010.
- [34] **Grethlein S., Rajan A., Bartz R. R., Przybelski R., Coursin D., Williams E. C.;** Blood Substitutes; emedicine.medscape.com;
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/hematologia/substitutos_de_la_sangre.pdf;
09.03.2010.
- [35] **Barbosa F. T., Jucá M. J., Castro A. A., Duarte J. L., Barbosa L. T.;** Artificial oxygen carriers as a possible alternative to red cells in clinical practice; Sao Paulo Med. J., 127 (2), 97–100, 2009.
- [36] **Brand A.;** Immunological aspects of blood transfusions; Transplant Immunology, 10, 183–190, 2002.
- [37] **Spahn D. R., Waschke K. F., Standl T., Motsch J., Van Huynegem L., Welte M., Gombotz H., Coriat P., Verkh L., Faithfull S., Keipert P.;** Use of Perflubron Emulsion to Decrease Allogeneic Blood Transfusion in High-blood-loss Non-Cardiac Surgery; Anesthesiology, 97, 1338–1349, 2002.
- [38] **Klein H. G.;** Transfusion Medicine; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.

- [39] **Kim H. W., Greenburg A. G.;** Artificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes: A Selected Review and Current Status; *Artificial Organs*, 28 (9), 813–828, 2004.
- [40] **Riess J. G.;** Blood substitutes and other potential biomedical applications of fluorinated colloids; *Journal of Fluorine Chemistry*, 114, 119–126, 2002.
- [41] **Lowe K. C., Ferguson E.;** Benefit and risk perceptions in transfusion medicine: blood and blood substitutes; *J. Intern. Med.*, 253, 498–507, 2003.
- [42] **LoNostro P., Choi S.-M., Ku C.-Y., Chen S.-H.;** Fluorinated Microemulsions: A Study of the Phase Behavior and Structure; *J. Phys. Chem. B*, 103, 5347–5352, 1999.
- [43] **Chang T. M. S.;** Future generations of red blood cell substitutes; *Journal of Internal Medicine*, 253, 527–535, 2003.
- [44] **Ferguson E., Prowse C., Townsend E., Spence A., van Hilten J. A., Lowe K.;** Acceptability of blood and blood substitutes; *J. Inter. Med.*, 263, 244–255, 2008.
- [45] **Lowe K. C.;** Genomics and Blood Substitutes for 21st Century Europe (“EuroBloodSubstitutes”); *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 34, 589–599, 2006.
- [46] **Paxian M.;** Künstliche Sauerstoffträger als Alternative zur Fremdbluttransfusion; *Anaesthesist*, [Suppl. 1] 50, 43–49, 2001.
- [47] **Winslow R. M.;** Hemoglobin Modification; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [48] **Alayash A. I.;** Redox and Radical Reactions of Hemoglobin Solutions: Toxicities and Protective Strategies; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [49] **Wong J. T.-F., Blumenstein J.;** Dextran-Hemoglobin; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [50] **Spahn D., Chassot P.-G.;** Clinical Trials in Cardiac Surgery; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [51] **Acharya S. A., Manjula B. N.;** Surface Decoration of Hemoglobin with Polyethylene Glycol; *Blood Substitutes*, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.

- [52] **Chang T. M. S.**; Nanodimension Biodegradable Polymeric Membrane Artificial Red Blood Cells; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [53] **Rentko V. T., Pearce L. B., Moon-Massat P. F., Gawryl M. S.**; Hemopure® (HBOC-201, Hemoglobin Glutamer-250 (Bovine)): Preclinical Studies; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [54] **Schöler M., Frietsch T., Jambor C., Knels R.**; Gibt es eine Zukunft für künstliche Blutersatzstoffe?; Dtsch. Med. Wochenschr., 135 (12), 575–581, 2010.
- [55] **Zander R., Adams H. A., Boldt J., Hiesmayr M. J., Meier-Hellmann A., Spahn D. R., Standl T.**; Forderungen und Erwartungen an einen optimalen Volumenersatz; Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther., 40 (12), 701–719, 2005.
- [56] **Riess J. G., Krafft M. P.**; Fluorocarbon Emulsions as *in vivo* Oxygen Delivery Systems: Background and Chemistry; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [57] **Riedel E.**; Anorganische Chemie; Walter de Gruyter, 3. verbesserte Auflage, 1994.
- [58] **Krafft M. P., Riess J. G.**; Perfluorochemical-Based Oxygen Therapeutics, Contrast Agents, and Beyond; Fluorine and Health, Tressaud A. & Haufe G., Elsevier, Amsterdam, 2008.
- [59] **Lowe K. C.**; Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems; Journal of Fluorine Chemistry, 118, 19–26, 2002.
- [60] **Spahn D. R.**; Blood substitutes Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions; Crit. Care, 3, R93–R97, 1999.
- [61] **Welte M.**; Stellenwert von Perfluorcarbonen; Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther., [Suppl. 2] 36, S165–S168, 2001.
- [62] **Kuznetsova I. N.**; Drug Synthesis Methods and Manufacturing Technology Perfluorocarbon Emulsions: Stability *in vitro* And *in vivo* (A Review); Pharmaceutical Chemistry Journal, 37 (8), 20–25, 2003.
- [63] **Clark L. C. Jr., Gollan F.**; Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure; Science, 152, 1755–1756, 1966.
- [64] **Sloviter H. A., Kamimoto T.**; Erythrocyte Substitute for Perfusion of Brain; Nature, 216, 458–460, 1967.

- [65] **Lowe K. C.**; Fluosol: The First Commercial Injectable Perfluorocarbon Oxygen Carrier; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [66] **Maevsky E. I., Ivanitsky H. R., Islamov B. I., Moroz V. V., Bogdanova L. A., Karmen N. B., Pushkin S. Y., Maslennikov I. A.**; Perftoran[®]; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [67] **Habler O., Voß B.**; Perioperatives Management bei Zeugen Jehovas; Der Anaesthetist, 59 (4), 297–311, 2010.
- [68] **Keipert P. E.**; Oxygent[™], a Perfluorochemical-Based Oxygen Therapeutic for Surgical Patients; Blood Substitutes, Winslow R. M., Elsevier, Oxford, 2006.
- [69] **Larbuissou R., Deby-Dupont G., Lamy M.**; Oxygen Carriers in Cardiac Surgery; Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine, 7 (1), 42–57, 2005.
- [70] **Biro G. P., Blais P., Rosen A. L.**; Perfluorocarbon Blood Substitutes; CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology, 6 (4), 311–374, 1987.
- [71] **Beneke K.**; Die Entwicklung der Kolloidwissenschaften • Ein historischer Abriss. <http://www.uni-kiel.de/anorg/lagaly/group/klausSchiver/polymere.pdf>; 12.12.2010.
- [72] **Dörfler H.-D.**; Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002.
- [73] **Hofmann T.**; Die Welt der vernachlässigten Dimensionen – Kolloide; Chem. Unserer Zeit, 38, 24–35, 2004.
- [74] **Graham T.**; Anwendung der Diffusion der Flüssigkeiten zur Analyse; Justus Liebigs Annalen der Chemie, 121 (1), 1–77, 1862.
- [75] **Ostwald W.**; Die Welt der vernachlässigten Dimensionen • Eine Einführung in die moderne Kolloidchemie • Mit besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendungen; Verlag von Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig, siebente und achte Auflage, 1922.
- [76] **Myers D.**; Surfaces, Interfaces, and Colloids – Principles and Applications; VCH, Weinheim, 1991.
- [77] **Lagaly G., Schulz O., Zimehl R.**; Dispersionen und Emulsionen; Steinkopff Darmstadt, 1997.
- [78] **Hofmann H., Jander G.**; Qualitative Analyse; Walter de Gruyter, 1972.

- [79] **International Union of Pure and Applied Chemistry**; Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units; http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t.pdf; 20.10.2010.
- [80] **Atkins P. W.**; Physikalische Chemie; VCH, Weinheim, 2. Auflage, 1996.
- [81] **Binks B. P.**; Emulsions – Recent Advances in Understanding; Modern Aspects of Emulsion Science, Binks B. P., The Royal Society of Chemistry, 1998.
- [82] **Mollet H., Grubenmann A.**; Formulierungstechnik – Emulsionen, Suspensionen, Feste Formen; Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [83] **Tadros T. F.**; Emulsion Science and Technology; Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [84] **Sjöblom J.**; Emulsions and Emulsion Stability; Surfactant Science Series Vol. 132, CRC Press, Second Edition, 2006.
- [85] **Taylor P.**; Ostwald ripening in emulsions; Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 99, 175–185, 1995.
- [86] **Schubert H.**; Emulgierungstechnik – Grundlagen, Verfahren und Anwendungen; Behr's Verlag, Hamburg, 1. Auflage, 2005.
- [87] **Anton N., Benoit J.-P., Saulnier P.**; Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review; Journal of Controlled Release, 128, 185–199, 2008.
- [88] **Horn D., Rieger J.**; Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase – Theory, Experiment, and Use; Angew. Chem. Int. Ed., 40, 4330–4361, 2001.
- [89] **Grillrestaurant Hadigari**. <http://www.hadigari-berlin.de/>; 06.10.2010.
- [90] **Vitale S. A., Katz J. L.**; Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: "The Ouzo-Effect"; Langmuir, 19, 4105–4110, 2003.
- [91] **Bouchemal K., Briançon S., Perrier E., Fessi H.**; Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization; Int. J. Pharm., 280, 241–251, 2004.
- [92] **Sitnikova N. L., Sprik R., Wegdam G.**; Spontaneously Formed *trans*-Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability; Langmuir, 21, 7083–7089, 2005.

- [93] **Ganachaud F., Katz J. L.;** Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices; *Chem. Phys. Chem.*, 6, 209–216, 2005.
- [94] **Carteau D., Pianet I., Brunerie P., Guillemat B., Bassani D. M.;** Probing the Initial Events in the Spontaneous Emulsification of *trans*-Anethol Using Dynamic NMR Spectroscopy; *Langmuir*, 23, 3561–3565, 2007.
- [95] **Zhang X. H., Ducker W.;** Interfacial Oil Droplets; *Langmuir*, 24, 110–115, 2008.
- [96] **Aubry J., Ganachaud F., Cohen Addad J. -P., Cabane B.;** Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: 1. Boundaries; *Langmuir*, 25, 1970–1979, 2009.
- [97] **Ruschak K. J., Miller C. A.;** Spontaneous Emulsification in Ternary Systems with Mass Transfer; *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 11 (4), 534–540, 1972.
- [98] **Bouchemal K., Briançon S., Fessi H., Chevalier Y., Bonnet I., Perrier E.;** Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules; *Material Science and Engineering C*, 26, 472–480, 2006.
- [99] **La Mer V.K.;** Nucleation in Phase Transitions; *Industrial and Engineering Chemistry*, 44 (6), 1270–1277, 1952.
- [100] **Privman V., Goia D. V., Park J., Matijević E.;** Mechanism of Formation of Mono-dispersed Colloids by Aggregation of Nanosize Precursors; *Journal of Colloid and Interface Science*, 213, 36–45, 1999.
- [101] **Vincent B., Kiraly Z., Obey T. M.;** Emulsion Formation by Nucleation and Growth Mechanisms; *Modern Aspects of Emulsion Science*, Binks B. P., The Royal Society of Chemistry, 1998.
- [102] **Nano-Studium.**
[http://studieren.de/studiengangsliste.0.html?&tx_assearchengine_pi1\[properties\]=N%3A0%3A0](http://studieren.de/studiengangsliste.0.html?&tx_assearchengine_pi1[properties]=N%3A0%3A0); 25.10.2010.
- [103] **Wegner K., Pratsinis S. E.;** Nanomaterialien; Winnacker • Küchler: Chemische Technik: Prozesse und Produkte; Band 2: Neue Technologien, Dittmeyer R., Keim W., Kreysa G., Oberholz A., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.

- [104] **Strebhardt K., Ullrich A.**; Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress; *Nature Reviews Cancer*, 8 (6), 473–480, 2008.
- [105] **Wagner V., Wechsel D.**; Technologiefrüherkennung, *Nanobiotechnologie II: Anwendungen in der Medizin und Pharmazie; Zukünftige Technologien*, 50, Düsseldorf, 2004.
- [106] **Müller R. H., Mäder K., Gohla S.**; Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (1), 161–177, 2000.
- [107] **Deamer D. D.**; From „Banghasomes” to liposomes: A memoir of Alec Bangham, 1921–2010; *The FASEB Journal*, 24 (5), 1308–1310, 2010.
- [108] **Maurer N., Fenske D. B., Cullis P. R.**; Developments in liposomal drug delivery systems; *Expert Opin. Biol. Ther.*, 1 (6), 923–947, 2001.
- [109] **Massing U., Fuxius S.**; Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness; *Drug Resistance Updates*, 3 (3), 171–177, 2000.
- [110] **Ravi Kumar M. N. V.**; Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices; *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3 (2), 234–258, 2000.
- [111] **Gulyaev A. E., Gelperina S. E., Skidan I. N., Antropov A. S., Kivman G. Ya., Kreuter J.**; Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles; *Pharmaceutical Research*, 16 (10), 1564–1569, 1999.
- [112] **Lamprecht A., Ubrich N., Yamamoto H., Schäfer U., Takeuchi H., Maincent P., Kawashima Y., Lehr C.-M.**; Biodegradable Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Treatment of Inflammatory Bowel Disease; *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 299 (2), 775–781, 2001.
- [113] **Pinto Reis C., Neufeld R. J., Ribeiro A. J., Veiga F.**; Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, 53–65, 2006.
- [114] **Kreuter J.**; *Nanoparticles in Colloidal Drug Delivery Systems*; J. Kreuter, Dekker, New York, 1994.

- [115] **Fresta M., Cavallaro G., Giammona G., Wehrli E., Puglisi G.;** Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs; *Biomaterials*, 17, 751–758, 1996.
- [116] **Pinto Reis C., Neufeld R. J., Ribeiro A. J., Veiga F.;** Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, 8–21, 2006.
- [117] **Moinard-Checot D., Chevalier Y., Briançon S., Fessi H., Guinebretière S.;** Nanoparticles for Drug Delivery: Review of the Formulation and Process Difficulties Illustrated by the Emulsion-Diffusion Process; *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (9/10), 2664–2681, 2006.
- [118] **Choinard F., Buczkowski S., Lenaerts V.;** Poly(Alkylcyanoacrylate) Nanocapsules: Physicochemical Characterization and Mechanism of Formation; *Pharmaceutical Research*, 11 (6), 869–874, 1994.
- [119] **Birrenbach G., Speiser P.;** Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology; *J. Pharm. Sci.*, 65, 1763–1766, 1976.
- [120] **Kreuter J., Speiser P.;** In vitro studies of poly(methylmethacrylate) adjuvants; *J. Pharm. Sci.*, 65, 1624–1627, 1976.
- [121] **Couvreur P., Kante B., Roland M., Guiot P., Bauduin P., Speiser P.;** Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties; *J. Pharm. Pharmacol.*, 31, 331–332, 1979.
- [122] **Kreuter J.;** Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems I: preparation methods; *Pharm. Acta Helv.*, 58, 196–209, 1983.
- [123] **Rollet J., Couvreur P., Roblot-Treupel L., Puisieux F.;** Physicochemical and morphological characterization of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (4), 361–364, 1986.
- [124] **Yu W. P., Chang T. M. S.;** Submicron biodegradable polymer membrane hemoglobin nanocapsules as potential blood substitutes: a preliminary report; *Art. Cells, Blood Subs., And Immob. Biotech.*, 22 (3), 889–893, 1994.
- [125] **Asua J. M.;** Miniemulsion polymerization; *Prog. Polym. Sci.*, 27, 1283–1346, 2002.
- [126] **Tiarks F., Landfester K., Antonietti M.;** Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization; *Langmuir*, 17, 908–918, 2001.

- [127] **Antonietti M., Landfester K.**; Polyreactions in miniemulsions; Prog. Polym. Sci., 27, 689–757, 2002.
- [128] **Landfester K.**; Strukturen in Miniemulsionen; Angew. Chem., 121, 4556–4576, 2009.
- [129] **Shinoda K., Saito H.**; The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT-method; Journal of Colloid and Interface Science, 30 (2), 258–263, 1969.
- [130] **Musyanovych A., Schmitz-Wienke J., Mailänder V., Walther P., Landfester K.**; Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions; Macromol. Biosci., 8, 127–139, 2008.
- [131] **Song C. X., Labhasetwar V., Murphy H., Qu X., Humphrey W. R., Shebuski R. J., Levy R. J.**; Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intra-vascular local drug delivery; Journal of Controlled Release, 43, 197–212, 1997.
- [132] **Quintanar-Guerrero D., Allémann E., Doelker E., Fessi H.**; Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique; Pharmaceutical Research, 15 (7), 1056–1062, 1998.
- [133] **Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y.**; Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behavior; Journal of Controlled Release, 25, 89–98, 1993.
- [134] **Torchillin V. P.**; Nanoparticulates as Drug Carriers; Imperial College Press, 2006.
- [135] **Mosqueira V. C. F., Legrand P., Pinto-Alphandary H., Puisieux F., Barratt G.**; Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties; Journal of Pharmaceutical Sciences, 89 (5), 614–626, 2000.
- [136] **Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J. Ph., Ammoury N., Benita S.**; Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement; Int. J. Pharm., 55, R1–R4, 1989.
- [137] **Guterres S. S., Fessi H., Barratt G., Devissaguet J.-P., Puisieux F.**; Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study; Int. J. Pharm., 113, 57–63, 1995.

- [138] **Altinbas N.**; Verkapselung von organischen Substraten in Polycyanoacrylat-Nanokapseln; Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen: Duisburg, 2003.
- [139] **Pisani E., Tsapis N., Paris J., Nicolas V., Cattell L., Fattal E.**; Polymeric Nano/Microparticles of Liquid Perfluorocarbons for Ultrasonic Imaging: Physical Characterization; *Langmuir*, 22, 4397–4402, 2006.
- [140] **Finder C.**; Optische Beobachtung von oberflächen gebundenen und frei beweglichen Nanopartikeln; Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen: Duisburg, 2005.
- [141] **Wohlgemuth M.**; Diffusionsexperimente an Nanopartikeldispersionen: Größenverteilung, Wirkstofffreisetzung und andere dynamische Phänomene; Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen: Duisburg, 2002.
- [143] **Powles J. G.**; Brownian motion – June 1827; *Phys. Educ.*, 13, 310–312, 1978.
- [143] **JPK Instruments**; The NanoWizard® AFM Handbook; Version 1.3, 08/2005.
- [144] **Nanopartikel**; Skript zum Fortgeschrittenen Praktikum der Physikalischen Chemie; Universität Duisburg-Essen, 2006.
- [145] **Zellermann A.-M.**; Untersuchung von Nano- und Mikrokapseln mittels Atomarer Kraft-Mikroskopie; Diplomarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen: Essen, 2008.
- [146] **Rasterkraftmikroskopie**; FP-Skript, Experimentalphysik VI, Universität Augsburg, 2010.
- [147] **Heindl E.**; Rasterkraftmikroskopie; Vortragsskript, Universität Regensburg, 2003.
- [148] **Schlawne C.**; Festkörper-NMR-Studien fluoralkylmodifizierter Silicagele; Diplomarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Universität Stuttgart, 2008.
- [149] **NMR-Spektroskopie**; Skript Physikalisch-Chemisches Fortgeschrittenen-Praktikum, Universität Stuttgart, 2008.
- [150] **Puls-NMR**; Skript Physikalisch-Chemisches Praktikum für Fortgeschrittene, Universität Ulm, 2008.

- [151] **Fung B. M.**; Selective detection of multiplets via double quantum coherence: A ^{19}F NMR study of perfluorodecalin; *Magnetic Resonance in Chemistry*, 21 (6), 397–398, 19

Kürzelerklärung der Proben- und Messbezeichnungen im Überblick I

Abkürzungen

nk: Nanokapsel(n)

ns: Nanosphäre(n)

emu: Emulsion

O: Ouzo(technik)

RS: Rotor-Stator-Rührer

LV: Lösemittelverdampfung

PFD: Perfluordecalin

(P)BCA: (Poly)butylcyanacrylat

PLGA: Polylactid-co-Glycolid

PT: Particle Tracking

AFM: Rasterkraftmikroskopie

NMR: Kernresonanzspektroskopie

LP: Leberperfusion

Opti1: Optimierung 1

Opti2: Optimierung 2

Opti3: Optimierung 3

a_{ij}: i = Tensidgehalt , j = Monomergehalt

Probe	Verhältnis Monomer/Tensid [%]	Probe	Verhältnis Monomer/Tensid [%]	Probe	Verhältnis Monomer/Tensid [%]
a₁₁	100/100	a₂₁	100/50	a₃₁	100/20
a₁₂	50/100	a₂₂	50/50	a₃₂	50/20
a₁₃	10/100	a₂₃	10/50	a₃₃	10/20

1zu9: Verhältnis der organischen zur wässrigen Phase = 1:9

1zu20: Verhältnis der organischen zur wässrigen Phase = 1:20

EtOH: Ethanol (als Lösemittel)

Kürzelerklärung der Proben- und Messbezeichnungen im Überblick II

Bezeichnungen

perfluorcarbongefüllte Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln mittels Ouzo-Technik

$nk(O)_{PBCA/PFD}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(O)_{PBCA/PFD} n \text{ PT}$	Bezeichnung für die PT-Messung der n. Probe mit $n = 1, 2, 3$
$nk(O)_{PBCA/PFD} \text{ AFMn}$	Bezeichnung für die AFM-Messung des n. Partikels der Probe mit $n = 1, 2$

perfluorcarbongefüllte Polylactidcoglycolid-Nanokapseln mittels Ouzo-Technik

$nk(O)_{PLGA/PFD}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(O)_{PLGA/PFD} n \text{ PT}$	Bezeichnung für die PT-Messung der n. Probe mit $n = 1, 2, 3$
$nk(O)_{PLGA/PFD} \text{ AFMn}$	Bezeichnung für die AFM-Messung des n. Partikels der Probe mit $n = 1, 2$

miglyolgefüllte Polybutylcyanacrylat-Nanokapseln mittels Rotor-Stator-Rührer

$nk(RS)_{PBCA/Miglyol}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(RS)_{PBCA/Miglyol} n \text{ PT}$	Bezeichnung für die PT-Messung der n. Probe mit $n = 1, 2, 3$
$nk(RS)_{PBCA/Miglyol} \text{ AFMn}$	Bezeichnung für die AFM-Messung des n. Partikels der Probe mit $n = 1, 2$

perfluorcarbongefüllte Polylactidcoglycolid-Nanokapseln mittels Lösemittelverdampfung

$nk(LV)_{PLGA/PFD}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(LV)_{PLGA/PFD} n \text{ PT}$	Bezeichnung für die PT-Messung der n. Probe mit $n = 1, 2, 3$
$nk(LV)_{PLGA/PFD} \text{ AFMn}$	Bezeichnung für die AFM-Messung des n. Partikels der Probe mit $n = 1, 2$

Optimierung 1 – Optimierung $nk(O)_{PBCA/PFD}$ durch Monomer- und Tensidkonzentrationsänderung

$nk(O^{Opti1}_{a_{ij}})_{PBCA/PFD}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(O^{Opti1}_{a_{ij}})_{PBCA/PFD} n \text{ PT}$	Bezeichnung für die PT-Messung der n. Probe mit $n = 1, 2$
$nk(O^{Opti1}_{a_{ij}})_{PBCA/PFD} \text{ AFMn}$	Bezeichnung für die AFM-Messung des n. Partikels der Probe mit $n = 1, 2$

$emu(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$	korrespondierenden Emulsion zu $nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$
$emu(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD} \text{ PT/AFM}$	Bezeichnung für die PT-Messung/AFM-Messung
$ns(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$	korrespondierenden Nanosphärendispersion zu $nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$
$ns(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD} \text{ PT/AFM}$	Bezeichnung für die PT-Messung/AFM-Messung

Optimierung 2 – Optimierung $nk(O)_{PBCA/PFD}$ durch Änderung des Phasenverhältnisses

$nk(O^{Opti2}_{1zux})_{PBCA/PFD}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(O^{Opti2}_{1zux})_{PBCA/PFD} \text{ PT/AFM}$	Bezeichnung für die PT-Messung/AFM-Messung

Optimierung 3 – Optimierung durch Verzicht auf giftige Lösemittel

$nk(RS^{Opti3}_{EtOH})_{PBCA/PFD}$	Probenbezeichnung allgemein
$nk(RS^{Opti3}_{EtOH})_{PBCA/PFD} \text{ PT/AFM}$	Bezeichnung für die PT-Messung/AFM-Messung

Leberperfusion an Proben der optimierten Synthese nach $nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD}$

$nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD} \text{ LP}$	Probenbezeichnung allgemein
LPI, LPII, LPIII, LPIV	Bezeichnung der Perfusionsreihe
$nk(O^{Opti1}_{a_{33}})_{PBCA/PFD} \text{ LPX ymin}$	Probenbezeichnung spezifiziert mit X = Angabe der Probenreihe, y = Dauer der Perfusion in Minuten